

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
14 août 2003 (14.08.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/066900 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷: C12Q 1/68,
C12N 15/29, 15/82, A01H 1/04, 5/00, C07K 16/16,
14/415, C07H 21/00

(FR). ROBAGLIA, Christophe [FR/FR]; 15 Résidence
des Adrets, Quartier Claou, F-13770 VENELLES (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR03/00397

(74) Mandataires : VIALLE-PRESLES, Marie José etc.;
Cabinet Ores, 36, rue de Saint-Petersbourg, F-75008
PARIS (FR).

(22) Date de dépôt international : 7 février 2003 (07.02.2003)

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GL, GD, GH, GI, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/01583 8 février 2002 (08.02.2002) FR
02/13678 31 octobre 2002 (31.10.2002) FR

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR),
brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : GENO-
PLANTE-VALOR [FR/FR]; 93, rue Hemi Rochefort,
F-91025 EVRY (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Investisseurs/Déposants (pour US seulement) :
CARANTA, Carole [FR/FR]; 29, chemin de la Roubine,
F-84510 CAUMONT SUR DURANCE (FR). RUFFEL,
Sandrine [FR/FR]; Chemin de la Rascasse, F-30390
ESTÈZARGUES (FR). BENDAÏMANE, Abdelhakid
[FR/FR]; 23, rue du Dr Vigne, F-91100 CORBEIL-ES-
SONNE (FR). PAILLOUX, Alain [FR/FR]; Mas le Pigeon-
nier, 558 Chemin de la Quarantaine, F-84250 LE THOR

Publiée :
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: E1H4E GENE MUTATIONS AND POTYVIRUS RESISTANCE

(54) Titre : MUTATIONS DU GENE E1H4E ET RÉSISTANCE AUX POTYVIRUS

(57) Abstract: The invention concerns a method for obtaining potyvirus resistant plants exhibiting one or several mutations in a preserved region of the eIF4E translation factor, defined by the following general sequence (I):
DX₁X₂X₃X₄KSSX₅QX₆AWGSSX₇RX₈X₉YTPSX₁₀VEHX₁₁FWX₁₂X₁₃YNNHX₁₄PSKLX₁₅X₁₆GAD wherein: X₁, X₂, X₃, X₄, X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀, X₁₂, X₁₃, X₁₅, et X₁₆ represent each a neutral amino acid; X₅ and X₁₄ represent a basic amino acid; X₁₁ represents an acid amino acid; D, K, S, Q, A, W, G, R, Y, T, F, V, E, N, I, H, P, and L have their usual one-letter code meaning.

(57) Abrégé : La présente invention concerne l'obtention de plantes résistantes aux potyvirus présentant une ou plusieurs mutations dans une région conservée du facteur de traduction eIF4E, définie par la séquence générale (I) suivante :
DX₁X₂X₃X₄KSSX₅QX₆AWGSSX₇RX₈X₉YTPSX₁₀VEHX₁₁FWX₁₂X₁₃YNNHX₁₄PSKLX₁₅X₁₆GAD dans laquelle : X₁, X₂, X₃, X₄, X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀, X₁₂, X₁₃, X₁₅, et X₁₆ représentent chacun un acide aminé neutre ; - X₅ et X₁₄ représentent un acide aminé basique ; - X₁₁ représente un acide aminé acide ; - D, K, S, Q, A, W, G, R, Y, T, F, V, E, N, I, H, P, et L ont leur signification usuelle en code 1-lettre.

WO 03/066900 A2

MUTATIONS DU GENE *ef4E* ET RESISTANCE AUX POTYVIRUS

La présente invention concerne un procédé de sélection ou d'obtention de plantes résistantes aux potyvirus. Le procédé est particulièrement applicable aux plantes de la famille des solanacées, des cucurbitacées, des crucifères et des composées.

- 5 L'invention comprend également les séquences permettant de conférer la résistance aux potyvirus et/ou de marquer les gènes de résistance ou de sensibilité à ces potyvirus.

- Le groupe des potyvirus dont le membre type est le virus Y de la pomme de terre ou PVY pour Potato Virus Y est le groupe de virus végétaux le plus important. En effet, les potyvirus sont capables d'infecter plus de 30 familles de plantes actuellement recensées. Ce groupe comprend au moins 180 membres ce qui correspond au tiers des virus de plantes actuellement connus. La transmission des potyvirus est réalisée par les pucerons (par exemple, *Myzus persicae*) selon le mode non-persistant. Les symptômes causés par les potyvirus sont des anomalies de coloration des feuilles (mosaïques, jaunissement des nervures), des déformations des feuilles, des nécroses nerveaires pouvant
- 10 conduire à la nécrose de la plante entière, et des réductions importantes de la taille de la plante malade influant fortement sur la productivité.

- Les solanacées, cucurbitacées, crucifères et composées sont particulièrement sensibles aux potyvirus. Les solanacées et plus particulièrement la tomate et le piment (ou poivron) sont infectées par au moins sept potyvirus distincts à travers le monde : le virus Y de la pomme de terre (PVY) est présent sur l'ensemble des zones de culture alors que les autres sont cantonnés à un continent (Tobacco Etch virus, Pepper Mottle Virus et Perou Tomato Virus sur le continent américain, Pepper Veinal Mottle Virus et Potyvirus E en Afrique, et Chili Veinal Mottle Virus en Asie). Cette compartimentation n'est cependant plus absolue, plusieurs potyvirus ayant été identifiés
- 20 hors de leur zone d'origine. En France, et plus généralement dans le bassin méditerranéen, le potyvirus prédominant est le PVY. Apparues dans les années 70, les épidémies de PVY se sont développées dans les cultures de plein champ puis dans les cultures sous abri où ont été mis en évidence, à partir de 1982, de nouveaux isolats de PVY causant des symptômes de nécrose particulièrement graves sur la tomate (Gebre-Selassie *et al.*, 1987).
- 30 Pour certains de ces potyvirus, il est possible de classer les isolats selon leur aptitude à contourner des allèles de résistance. C'est le cas du PVY vis-à-vis du gène *pvr2* chez le piment, seul gène de résistance utilisé de longue date par les sélectionneurs mais contourné dans les zones du pourtour méditerranéen et dans les zones tropicales. Malgré la prédominance du PVY en France, l'internationalisation du marché de la semence rend
- 35 nécessaire l'utilisation de gènes contrôlant la résistance à ces différents potyvirus par les sélectionneurs qui vendent leurs semences à l'étranger. Plus généralement, considérant l'importance économique des infections par potyvirus et l'absence de moyens directs de

lutte contre ce type d'infection, la recherche de variétés végétales résistantes constitue un des axes principaux de l'amélioration des plantes.

Les potyvirus ont une structure filamenteuse non-enveloppée (Langenberg et Zhang, 1997) de 680 à 900 nm de long et de 11 à 15 nm de large (Dougherty et Carrington, 1988 ; Riechmann et al., 1992). Le génome viral est constitué d'un ARN simple brin sens d'une longueur approximative de 10 kb. L'ARN simple brin possède à son extrémité 3' une queue poly A et se lie en 5' à une protéine virale appelée VPg (Murphy et al., 1990, Takahashi et al., 1997). L'ARN viral code pour 10 protéines impliquées dans le clivage des polyprotéines, la réplication du génome, le mouvement de cellule-à-cellule et le mouvement longue distance, la transmission par pucerons... La lutte contre les virus n'est réalisable qu'indirectement. En effet, il est seulement possible d'éliminer le vecteur de la maladie (les pucerons dans ce cas) ou de cultiver des variétés résistantes à l'infection virale et/ou aux vecteurs.

Face à une agression par un pathogène (virus, bactéries, champignons ou nématodes), la plante possède plusieurs stratégies pour se défendre ou résister à l'infection. Parmi les stratégies de défense, la plante peut mettre en place :

- des systèmes de défense mécaniques en élaborant et en renforçant des barrières physiques constituées d'une cuticule épaisse sur les feuilles et/ou d'un dépôt de callose ou de lignines sur les parois cellulaires. Ainsi, l'entrée et le mouvement des pathogènes dans la plante sont rendus plus difficiles.
- des systèmes de défense chimiques ou biochimiques en synthétisant des composés toxiques comme par exemple, les tanins, les phytoalexines et différents complexes protéiques.

Parmi les stratégies de résistance, on distingue la résistance non-hôte (lorsque toutes les entités d'une espèce sont résistantes à un pathogène donné) de la résistance hôte (lorsque au moins une entité de l'espèce est sensible à une souche de l'agent pathogène). La résistance hôte, la plus connue à ce jour et la mieux caractérisée, est celle faisant intervenir un gène majeur, dominant. Lorsque le gène majeur se trouve en présence d'un gène spécifique d'avirulence de l'agent pathogène, l'incompatibilité entre la plante et le pathogène est mise en place et la plante est résistante. Cette interaction, décrite par Flor (1955) est également appelée "modèle gène-à-gène" et est très souvent associée à une nécrose localisée du tissu végétal au site d'infection (réaction d'hypersensibilité). Bien qu'assez largement répandu, ce modèle "gène-à-gène" n'est pas universel car certains systèmes de résistance décrits ne fonctionnent pas selon ce modèle, les différences résidant notamment dans le mode d'action du gène de résistance. Il existe des gènes récessifs, superdominants ou exerçant une dominance incomplète. Plusieurs gènes d'avirulence peuvent interagir avec un même gène de résistance. De nombreuses résistances sont également polygéniques, plusieurs gènes présents dans la plante sont alors

impliqués dans la résistance, chacun d'eux ayant un effet de protection partielle et pouvant contrôler des mécanismes différents.

A ce jour, de nombreux gènes dominants suivant le modèle "gène-à-gène" ont été clonés. Ils possèdent des structures géniques apparentées bien qu'ils agissent
5 contre des agents pathogènes variés (virus, champignons, bactéries, insectes, nématodes). La présence de domaines conservés a permis de définir 4 grandes classes (Hammond-Kosack et Jones, 1997) de gènes dominants.

Singulièrement, on estime que 40% des résistances aux potyvirus sont récessives alors que dans les autres groupes viraux, cette proportion n'atteint que 20% en
10 moyenne. Fraser (1992) a émis l'hypothèse que les résistances récessives seraient différentes des résistances dominantes de type "gène-à-gène" et résulteraient d'un déficit ou d'une altération spécifique du produit d'un gène de l'hôte nécessaire à l'accomplissement du cycle viral dans la plante. Les allèles dominants de sensibilité correspondraient donc à la disponibilité de ce produit impliqué dans les interactions
15 plante/pathogène.

Il a été montré que des mutations ponctuelles dans le gène viral codant pour la protéine VPg sont impliquées dans le contournement de la résistance aux potyvirus chez plusieurs couples hôtes-pathogènes. Ceci a été montré chez les couples
20 TVMV/*Nicotiana tabacum* (gène *va*), PVY/tomate (gène *pot-1*), LMV/Laitue (gène *mol*) et PSbMV/pois (gène *sbm1*), (Keller *et al.*, 1998, Morel, 2001, Redondo, 2001, Nicolas *et al.*, 1997). Cela n'exclut pas que d'autres gènes viraux puissent également intervenir.

Par ailleurs, Wittman *et al.* (1997) ont montré qu'une isoforme du facteur d'initiation de la traduction eucaryotique eIF4E d'*Arabidopsis thaliana* interagit avec la protéine virale VPg du virus de la mosaïque du navet (TuMV). Cette même
25 interaction a été détectée entre la VPg du TEV et le eIF4E de tabac et de tomate (Schaad *et al.*, 2000).

Le gène *eIF4E* code pour un facteur eucaryotique d'initiation de la traduction des ARN. eIF4E correspond à une des sous-unités du facteur de traduction eIF4F (chez le germe de blé, il correspond à la sous-unité p26). Le facteur de traduction
30 eIF4E se fixe à la coiffe des ARNm au niveau des m⁷G. La structure de eIF4E se caractérise par une région riche en résidus tryptophane (10 chez *Arabidopsis thaliana*, 11 chez le blé et 12 chez les mammifères). Ces résidus tryptophane seraient impliqués dans la liaison au groupe fonctionnel m⁷G (Rudd, K. *et al.*, 1998). Le facteur de traduction eIF4E est codé par une famille multigénique. Par exemple chez *Arabidopsis thaliana*, 4 copies de
35 eIF4E ont été identifiées (Rodriguez *et al.*, 1998, Robaglia *et coll.*, com. pers.). Ces copies présentent, deux à deux, entre 44 et 82% d'identité.

Tous ces travaux font état de la corrélation entre l'interaction eIF4E/VPg et la sensibilité de la plante aux potyvirus; mais aucun ne souligne ni même ne suggère

que cette interaction pourrait conduire à une résistance. Au contraire, il est même indiqué dans Schaad *et al.*, 2000 que l'interaction VPg/eIF4E ne joue pas de rôle dans la résistance, car les déterminants génétiques de l'interaction VPg/eIF4E sont distincts de ceux permettant aux potyvirus (*via* la VPg) de contourner la résistance.

- 5 Il est donc du mérite des Inventeurs, dans un tel état de la technique, d'avoir mis en évidence des protéines eIF4E, ainsi que les gènes correspondants, intervenant dans la résistance ou la sensibilité des plantes aux potyvirus.

Les Inventeurs ont notamment constaté que différentes plantes résistantes aux potyvirus présentaient des mutations ponctuelles situées dans une même
10 région de la protéine eIF4E ; cette région, qui est très conservée entre les protéines eIF4E issues de diverses espèces végétales, notamment de solanacées, est définie par la séquence générale (I) suivante :

DX₁X₂X₃X₄KSX₅QX₆AWGSSX₇RX₈X₉YTF SX₁₀VE X₁₁FWX₁₂X₁₃YNNIHX₁₄PSKLX₁₅X₁₆GA
D

15 dans laquelle :

- X₁, X₂, X₃, X₄, X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀, X₁₂, X₁₃, X₁₅, et X₁₆ représentent chacun un acide aminé neutre ;
- X₅ et X₁₄ représentent un acide aminé basique ;
- X₁₁ représente un acide aminé acide ;
- 20 - D, K, S, Q, A, W, G, R, Y, T, F, V, E, N, I, H, P, et L ont leur signification usuelle en code 1-lettre.

On définit ici comme « acide aminé neutre », tout acide aminé choisi parmi les suivants : alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, tryptophane, phénylalanine, méthionine, glycine, sérine, thréonine, tyrosine, cystéine, glutamine,
25 asparagine. On définit comme « acide aminé chargé », tout acide aminé choisi parmi les suivants : histidine, lysine, arginine, glutamate, aspartate. Parmi ces acides aminés chargés, histidine, la lysine ou l'arginine sont des acides aminés basiques, et le glutamate et l'aspartate des acides aminés acides.

La séquence (I) est également représentée dans la liste de séquences en
30 annexe sous le numéro SEQ ID NO:1

Les mutations mises en évidence par les Inventeurs chez le poivron sont les suivantes :

- la substitution de l'acide aminé neutre X₃ de la séquence (I) par un acide aminé basique ;
- 35 - la substitution de l'acide aminé neutre X₇ de la séquence (I) par un acide aminé basique ;
- la substitution du résidu aspartate en position C-terminale de la séquence (I) par un acide aminé neutre.

La mutation de X_3 a été observée chez des lignées de poivron présentant deux types différents de résistance aux potyvirus ($pvr2^1$ et $pvr2^2$) ; les poivrons présentant le phénotype $pvr2^1$ possèdent en outre la mutation en position X_7 , et les poivrons présentant le phénotype $pvr2^2$ possèdent en outre la mutation en position C-terminale.

5 Chez la tomate, les Inventeurs ont notamment observé les mutations suivantes :

- la substitution de l'acide aminé neutre X_1 de la séquence (I) par un acide aminé basique ;
- la substitution du résidu Ala du motif AWGSS de la séquence (I) par un acide aminé acide ;

10

Grâce à la très forte conservation de séquence des gènes eIF4E chez les eucaryotes et à la disponibilité de structure 3D des protéines eIF4E de la souris et de la levure (Marcotrigiano et al., 1997, Cell 89 : 951-961 ; Matsuo et al., 1997, Nat. Struct. Biol. 4 : 717-724), les positions des mutations par rapport à la structure 3D de eIF4E chez 15 le piment et la tomate peuvent être déterminées. Toutes ces mutations sont physiquement proches et en surface de la protéine. Par ailleurs, ces mutations ne concernent pas des acides aminés très conservés chez les eucaryotes, ni ceux impliqués dans les fonctions essentielles de eIF4E, à savoir la reconnaissance de la coiffe ou l'interaction entre eIF4E et eIF4G ou les 4E-binding protein.

20

Toutefois, il est probable que ces mutations exercent un effet sur l'interaction VPg/eIF4E par modification de la structure de eIF4E au niveau de la ou des régions de celle-ci impliquées dans cette interaction. Cette modification de la structure résulte vraisemblablement de la substitution d'acides aminés par des acides aminés de charge différente (remplacement d'acides aminés neutres par des acides aminés chargés, 25 ou à l'inverse d'acides aminés chargés par des acides aminés neutres, ou des acides aminés de charge opposée) qui constitue le point commun à l'ensemble des mutations mises en évidence par les Inventeurs. On peut donc raisonnablement supposer que d'autres mutations de même type dans une protéine eIF4E végétale, au niveau de la région définie par la séquence (I) entraîneront des modifications de structure similaire, produisant le même effet sur l'interaction VPg/eIF4E.

30

En particulier, il apparaît que la substitution d'au moins un des acides aminés neutres X_1 , X_2 , X_3 ou X_4 par un acide aminé chargé, notamment un acide aminé basique, joue un rôle important dans la résistance aux potyvirus.

Ces observations permettent de proposer des outils, notamment des 35 outils génétiques, de criblage et/ou d'obtention de plantes résistantes ou sensibles aux potyvirus.

La présente invention concerne plus particulièrement un procédé de sélection de plantes résistantes aux potyvirus, caractérisé en ce qu'il comprend la détection dans les plantes à tester :

- de la présence ou de l'absence d'une protéine eIF4E (dénommée ci-après :
5 « protéine eIF4E de type sauvage ») comprenant une région définie par la séquence (I) ci-dessus, ou d'une séquence codant pour ladite protéine ;
- de la présence ou de l'absence d'une protéine eIF4E mutante comprenant une région dérivée de celle définie par la séquence (I) ci-dessus, par substitution d'au moins un acide aminé neutre de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé, de
10 préférence un acide aminé basique et/ou substitution d'au moins un acide aminé chargé de ladite séquence (I) par un acide aminé neutre ou un acide aminé de charge opposée, ou d'une séquence codant pour ladite protéine ;
- et la sélection des plantes où l'on détecte une protéine eIF4E mutante ou une séquence codant pour ladite protéine, et où l'on ne détecte pas de protéine eIF4E
15 de type sauvage ou de séquence codant pour ladite protéine.

La présente invention a également pour objet un procédé de sélection de plantes utilisable pour l'obtention de plantes résistantes aux potyvirus, caractérisé en ce qu'il comprend la détection dans les plantes à tester de la présence ou de l'absence d'une protéine eIF4E mutante telle que définie ci-dessus ou d'une séquence codant pour ladite
20 protéine, et la sélection des plantes où l'on détecte ladite protéine eIF4E mutante ou une séquence codant pour ladite protéine.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de l'invention, ladite protéine eIF4E mutante comprend une région dérivée de celle définie par la séquence (I) ci-dessus, par :

- a) substitution d'au moins un des acides aminés X₁, X₂, X₃ ou X₄, de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé, et
25
- b) substitution d'au moins un des autres acides aminés neutres de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé et/ou substitution d'au moins un acide aminé chargé de ladite séquence (I) par un acide aminé neutre ou un acide aminé de charge opposée.
30

La détection de la présence ou de l'absence d'une protéine eIF4E de type sauvage ou mutante, peut s'effectuer notamment à l'aide d'anticorps spécifiquement dirigés contre la forme recherchée de la protéine eIF4E. Il peut s'agir notamment d'anticorps dirigés soit contre la forme sauvage soit contre la forme mutante de la région
35 de eIF4E définie par la séquence (I).

Pour la détection de la présence ou de l'absence d'une séquence codant pour une protéine eIF4E de type sauvage ou d'une séquence codant pour une protéine eIF4E mutante, on dispose de nombreux outils ; il peut s'agir notamment de

- polynucléotides dérivés de la séquence du gène *eIF4E* et en particulier de polynucléotides capables de s'hybrider sélectivement soit avec un allèle sauvage soit avec un allèle mutant de *eIF4E*, tels que définis ci-dessus ou de polynucléotides permettant l'amplification de la région de *eIF4E* contenant la mutation recherchée ; il peut s'agir également d'enzymes de restriction reconnaissant une séquence-cible présente dans la forme sauvage, mais non dans la forme mutée (ou l'inverse).

La présente invention a ainsi pour objet l'utilisation d'un outil de sélection choisi parmi :

- a) un polynucléotide codant pour une protéine *eIF4E* de type sauvage ou mutante, telles que définies ci-dessus ;
 - b) un polynucléotide complémentaire du polynucléotide a) ;
 - c) un fragment d'au moins 10 pb d'un polynucléotide a) ou b) ;
 - d) un anticorps dirigé contre une protéine *eIF4E* de type sauvage ou mutante, telles que définies ci-dessus ;
- pour la sélection de plantes résistantes aux potyvirus.

En particulier, l'invention concerne en un procédé de sélection de plantes résistantes aux potyvirus caractérisé en ce qu'il comprend la mise en œuvre d'au moins un moyen de sélection choisi dans le groupe des outils génétiques (ou apparentés) comprenant :

- * A / tout ou partie d'une au moins des séquences sélectionnées dans le sous-groupe comportant :
 - SEQ ID NO: 2,
 - SEQ ID NO:4,
 - SEQ ID NO:6 et 8,
 - tout analogue de ces séquences résultant de la dégénérescence du code génétique,
 - toute séquence d'ADNc complémentaire d'au moins l'une de ces séquences et/ou d'au moins un de leurs analogues;
- * B / tout ou partie d'un au moins des produits de transcription des séquences A ;
- * C / tout ou partie d'un au moins des produits de traduction des séquences A ;
- * D / tout ou partie d'au moins un anticorps spécifique d'au moins un produit de traduction de C ;
- * E / et toute association des outils A, B, C, D.

- De préférence, les moyens de sélection sont sélectionnés parmi les sous-groupes d'outils A/ et/ou B/, et plus préférentiellement encore parmi le sous-groupe d'outils A/.

Par ce repérage simple, aisé et fiable de plantes résistantes ou sensibles aux potyvirus, les inventeurs ont ainsi mis au point un nouveau procédé s'appuyant sur l'utilisation de séquences correspondant au gène *elF4E*.

Le procédé objet de l'invention s'applique particulièrement aux
5 solanacées, cucurbitacées, crucifères et composés et plus précisément aux plantes des genres *Lycopersicon*, *Capsicum*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Lactuca*, *Cucumis*, *Arabidopsis* etc....

Les potyvirus concernés sont, par exemple, le virus Y de la pomme de terre (PVY), le virus de la gravure du tabac (TEV) et/ou le virus de la mosaïque de la laitue (LMV), et/ou le virus de la mosaïque jaune de la courgette (ZYMV) et/ou le virus
10 de la mosaïque du navet (TuMV).

Pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention, on utilise des séquences nucléotidiques et/ou des séquences peptidiques ou des enzymes de restriction en tant que moyens de détection, sondes ou amorces, pour sélectionner des plantes
15 résistantes ou sensibles aux potyvirus.

Ces moyens de détections comprennent en particulier des sondes ou amorces nucléotidiques.

On entend par « amorce » au sens de la présente invention toute séquence polynucléotidique utilisable pour amplifier une séquence d'un gène *elF4E*
20 susceptible de comprendre une mutation associée à la résistance aux potyvirus. Il s'agit notamment de polynucléotides utilisables pour amplifier tout ou partie de la séquence de *elF4E* codant pour la région de *elF4E* définie par la séquence (I), ou de la séquence mutante qui en est dérivée.

On entend par « sonde » au sens de la présente invention toute séquence
25 polynucléotidique, s'hybridant avec un gène *elF4E* de type sauvage ou avec un gène *elF4E* mutant tel que définis ci-dessus. Ceci inclut notamment les séquences nucléotidiques capables de s'hybrider sélectivement soit avec un allèle du gène *elF4E* associé à la résistance aux potyvirus, soit avec un allèle du gène *elF4E* associé à la sensibilité aux potyvirus.

30 Ces sondes et ces amorces peuvent être employées comme marqueurs spécifiques des plantes résistantes ou sensibles aux potyvirus.

Conformément à l'invention, on est en mesure de faire le tri entre les plantes sensibles et les plantes résistantes aux potyvirus au moyen des outils génétiques (ou apparentés) (A) à (E), voire d'enzymes de restriction spécifiques. Ces dernières seront
35 décrites infra.

Les séquences (A) nucléotidiques SEQ ID NO: 2, 4, 6, et 8 correspondent à des gènes *elF4E* de différentes solanacées impliqués dans la résistance aux potyvirus codant pour un facteur eucaryotique d'initiation de la traduction des ARN.

La SEQ ID NO: 8 correspond à un allèle récessif *elF4E* de résistance à un potyvirus, tandis que SEQ ID NO: 2, 4, et 6 représentent des allèles dominants *elF4E* de sensibilité à un potyvirus.

- Il a donc été découvert conformément à l'invention des moyens de
5 sélection ou repères génétiques de résistance ou de sensibilité aux potyvirus. Le procédé de sélection suivant l'invention peut faire intervenir séparément ou ensemble les deux types de moyens de sélection ou repères.

- Naturellement, l'invention englobe également tous les équivalents à ces séquences (A) nucléotidiques SEQ ID NO: 2, 4, 6, et 8, qui conservent la fonction de
10 repère génétique *elF4E* de sensibilité/résistance aux potyvirus propres aux séquences de référence. Pour ce qui concerne les ADN, il s'agit notamment des analogues de dégénérescence génétique et des séquences d'ADNc complémentaires des séquences de référence. Les équivalents polynucléotidiques des séquences (A) de référence se trouvent également parmi leurs produits (ARN) de transcription (B). Les protéines (C) issues de
15 (A) et de (B) constituent d'autres repères intracellulaires permettant la sélection de plantes résistantes ou sensibles aux potyvirus. Outre les cibles (A), (B), (C), les moyens de sélection de l'invention peuvent aussi être des sondes nucléotidiques aptes à s'hybrider avec des cibles nucléotidiques (A) et (B) complémentaires, ou bien encore des moyens de détection protéiques (anticorps D) aptes à s'apparier avec des cibles antigéniques (C)
20 spécifiques. Il est envisageable de combiner tous ces moyens équivalents (A), (B), (C) & (D) pour former un outil de sélection (E).

Les moyens selon l'invention couvrent également tout fragment des séquences (A), (B), (C) & (D). Par "fragment" on entend, selon l'invention :

- soit un polynucléotide d'au moins 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500
25 nucléotides contigus de la séquence de référence ; des fragments préférés sont ceux qui sont capables de s'hybrider sélectivement en conditions stringentes avec ladite séquence de référence.
- soit un polyaminoacide d'au moins 3, 6, 10, 15, 30, 60, 100, 150, 200
30 aminoacides contigus de la séquence de référence ; des fragments préférés sont ceux qui sont capables de s'hybrider sélectivement en conditions stringentes avec ladite séquence de référence.

Selon une modalité avantageuse de l'invention, le procédé est caractérisé en ce que :

- on met en présence au moins un moyen de détection comprenant au moins l'un
35 des outils A,B,C,D,E selon la revendication 1 et/ou au moins une enzyme de restriction, avec au moins un extrait génomique et/ou protéique d'une plante à tester,

- on soumet ledit extrait génomique et/ou protéique, éventuellement apparié et/ou hybridé et/ou digéré, à au moins une séparation,
- on révèle les éventuels appariements et/ou hybridations et/ou digestions susceptibles de se produire,
- 5 - et on procède à la lecture des résultats pour conclure finalement sur la présence ou l'absence d'un allèle de résistance (*pvr2⁺*) ou d'un allèle de sensibilité (*pvr⁻*) à au moins un potyvirus.

Ce procédé s'inscrit dans le cadre des méthodologies connues dans le domaine de la détection et de la reconnaissance de caractéristiques génétiques de
10 végétaux.

Selon un premier mode de mise en œuvre du procédé, dans lequel le principe de sélection est fondé sur l'utilisation d'une ou plusieurs enzymes de restriction spécifiques, le procédé peut répondre à la méthodologie suivante :

- on amplifie par PCR la séquence codante du gène *eIF4E*, à partir de l'ADN de la plante à tester, par exemple à l'aide des amorces SEQ ID NO: 18 et/ou 19,
- 15 - on digère le produit d'amplification avec une enzyme de restriction appropriée ;
- on sépare les éventuels fragments obtenus,
- et on sélectionne les plantes résistantes ou sensibles selon le profil de restriction dudit produit d'amplification.

Par exemple, des plantes sensibles aux potyvirus peuvent être détectées par un profil de restriction faisant apparaître la présence d'un site de coupure par l'enzyme *TspRI* ou l'un de ses isoschizomères et les plantes résistantes aux potyvirus peuvent être détectées par un profil de restriction faisant apparaître l'absence dudit site de coupure par *TspRI* ou l'un de ses isoschizomères et la présence d'un site de coupure par l'enzyme
25 *MvnI* ou l'un de ses isoschizomères.

Selon un deuxième mode de mise en œuvre du procédé, correspondant au cas où le mode de sélection est l'hybridation de séquences nucléotidiques complémentaires, le procédé consiste de préférence :

- à extraire l'ADN des plantes,
- 30 - à soumettre éventuellement cet ADN à une digestion enzymatique à l'aide d'au moins une enzyme de restriction,
- à dénaturer l'ADN éventuellement digéré,
- à mettre en présence l'ADN ainsi dénaturé, avec la sonde elle-même préalablement dénaturée et dotée d'au moins un marqueur, de façon à réaliser l'hybridation,
- 35 - à éliminer l'ADN et la sonde non hybridée,
- à révéler l'hybridation à l'aide du marqueur,

- et à sélectionner des plantes qui possèdent un profil d'hybridation correspondant à la co-ségrégation de la cible hybridée avec la sonde marquée et de l'allèle de résistance ou de sensibilité.

La distinction entre les plantes sensibles et les plantes résistantes peut s'effectuer, dans le cas où l'ADN a été digéré par une enzyme de restriction, par la différence de taille des fragments hybridés.

Elle peut également s'effectuer à l'aide d'une sonde capable de s'hybrider sélectivement avec l'allèle de résistance ou l'allèle de sensibilité. L'hybridation des molécules simple brin de la sonde et de la cible est effectuée de préférence dans des conditions d'hybridation stringentes permettant une hybridation sélective, qui peuvent être déterminées de manière bien connue de l'homme du métier. En général la température d'hybridation et de lavage est inférieure d'au moins 5°C au Tm de la séquence de référence à un pH donné et pour une force ionique donnée. Typiquement la température d'hybridation est d'au moins 30°C pour un polynucléotide de 15 à 50 nucléotides et d'au moins 60°C pour un polynucléotide de plus de 50 nucléotides.

Le niveau du signal généré par l'interaction entre la séquence capable de s'hybrider de manière sélective et les séquences de référence est généralement 10 fois, de préférence 100 fois plus intense que celui de l'interaction des autres séquences d'ADN générant le bruit de fond.

Avec une sonde marquée par exemple à l'aide d'un élément radioactif, tel que le ^{32}P , ou d'une enzyme greffée, telle que la peroxydase, l'hybridation est aisément révélée qualitativement et quantitativement.

L'ADN utilisé dans le premier ou le deuxième mode de mise en œuvre peut être soit de l'ADN total, soit de l'ADNc.

Selon un troisième mode de mise en œuvre (parmi d'autres) du procédé selon l'invention, correspondant au cas où le mode de sélection est l'appariement anticorps/antigène, le procédé consiste, de préférence, à détecter la présence d'un polypeptide en partie constitué de tout ou partie d'une des séquences d'acides aminés décrites ci-dessous et incluses dans l'invention. Le procédé peut consister à mettre en contact l'échantillon à tester avec un anticorps tel que décrit ci-dessus puis à détecter le complexe antigène / anticorps formé.

Quel que soit le mode de sélection, le procédé de sélection selon l'invention est fiable et sensible.

La présente invention a également pour objet un polynucléotide codant pour une protéine eIF4E mutante comprenant une région dérivée de celle définie par la séquence (I) ci-dessus, par substitution d'au moins un acide aminé neutre de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé, de préférence un acide aminé basique et/ou

substitution d'au moins un acide aminé chargé de ladite séquence (I) par un acide aminé neutre ou un acide aminé de charge opposée.

Selon un mode de réalisation préféré, ledit polynucléotide code pour une protéine eIF4E mutante qui comprend une région dérivée de celle définie par la séquence

5 (I) ci-dessus, par :

- a) substitution d'au moins un des acides aminés X₁, X₂, X₃ ou X₄, de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé, et
 - b) substitution d'au moins un des autres acides aminés neutres de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé et/ou substitution d'au moins un acide aminé chargé de ladite séquence (I) par un acide aminé neutre ou un acide aminé de charge opposée.
- 10

Des polynucléotides conformes à l'invention sont par exemple ceux qui codent pour les variants des séquences SEQ ID NO: 22 ou 23 associés à la résistance aux potyvirus.

15 Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est décrite par une séquence choisie dans le groupe comprenant tout ou partie des séquences suivantes:

- SEQ ID NO: 2
- SEQ ID NO: 4
- 20 - SEQ ID NO: 6
- SEQ ID NO: 8

La séquence nucléotidique SEQ ID NO:2 est une séquence d'ADNc obtenue à partir d'ADN de tabac et correspondant au gène de tabac. La séquence nucléotidique SEQ ID NO:4 est une séquence codant pour une protéine eIF4E d'une variété de *Lycopersicon esculentum* sensible aux potyvirus. Les séquences SEQ ID NO: 6 et 8 sont des séquences codant pour des protéines eIF4E de piment (*Capsicum annum*), variétés Yolo Wonder et Yolo Y respectivement.

25

La présente invention a également pour objet des amorces permettant l'amplification d'un gène *eIF4E*, ou d'une portion de celui-ci susceptible de contenir au moins une mutation, telle que définie ci-dessus, associée à la résistance aux potyvirus ; il s'agit notamment d'amorces permettant l'amplification de la séquence de *eIF4E* codant pour la région de eIF4E définie par la séquence (I), ou d'une séquence mutante qui en est dérivée.

30

Des amorces conformes à l'invention peuvent être aisément définies par l'homme du métier, à partir des séquences nucléotidiques ou peptidiques décrites dans la présente invention.

35

A titre d'exemples non-limitatifs, on citera : les amorces d'amplification constituées par les séquences-amorces nucléotidiques SEQ ID NO: 18 & 19 ; les amorces

de clonage SEQ ID NO: 10 à 17 ; les amorces de criblage de banque BAC constituées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 20 & 21.

Les SEQ ID NO : 18 & 19 sont des amorces issues de la séquence codante de *elF4E* du piment Yolo Wonder, permettant notamment par amplification PCR puis par digestion enzymatique, la détection des séquences nucléotidiques porteuses des allèles de résistance *pvr2* et de sensibilité *pvr⁺* aux potyvirus. Les amorces de clonage SEQ ID NO : 10 & 11 dégénérées et les SEQ ID NO : 12 à 17 non dégénérées, ont été définies sur un alignement des séquences de *elF4E* de tabac, tomate et *Arabidopsis* et utilisées pour la synthèse (RACE) de sondes ADNc de détection de *elF4E* dans le génome de tomate et de piment. Les amorces SEQ ID NO: 20 & 21 de criblage de banque BAC sont non dégénérées. Ces amorces SEQ ID NO: 10 à 17, 20 & 21 peuvent éventuellement être utilisées directement ou indirectement (construction d'outils de sélection) dans la détection de caractéristiques de résistance ou de sensibilité aux potyvirus.

La présente invention a également pour objet une protéine *elF4E* mutante comprenant une région dérivée de celle définie par la séquence (I) ci-dessus, par substitution d'au moins un acide aminé neutre de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé, de préférence un acide aminé basique et/ou substitution d'au moins un acide aminé chargé de ladite séquence (I) par un acide aminé neutre ou un acide aminé de charge opposée.

Selon un mode de réalisation préféré, ladite protéine *elF4E* mutante comprend une région dérivée de celle définie par la séquence (I) ci-dessus, par :

- a) substitution d'au moins un des acides aminés X_1, X_2, X_3 ou X_4 de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé, et
- b) substitution d'au moins un des autres acides aminés neutres de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé et/ou substitution d'au moins un acide aminé chargé de ladite séquence (I) par un acide aminé neutre ou un acide aminé de charge opposée.

La présente invention couvre aussi les produits de traduction des séquences nucléotidiques SEQ ID NO: 2, 4, 6, et 8, à savoir les polypeptides choisis dans le groupe comprenant tout ou partie des séquences suivantes:

- SEQ ID NO: 3
- SEQ ID NO: 5
- SEQ ID NO: 7
- SEQ ID NO: 9.

Les moyens de sélection résistance / sensibilité des plantes aux potyvirus, constitués par des séquences d'acides aminés, sont de préférence utilisés comme cibles permettant le repérage. Il s'agit alors de moyens de sélection indirects qui sous-tendent la mise en œuvre de moyens de détection spécifiques de ces cibles peptidiques.

Ces moyens de détection sont avantageusement des anticorps qui constituent un autre objet de la présente invention. Ainsi, lesdits anticorps sont caractérisés en ce qu'ils sont spécifiquement dirigés contre tout ou partie d'un au moins des produits de traduction C, et plus particulièrement des séquences d'acides aminés SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 22, ou 23 ou
5 un fragment d'au moins 6 acides aminés de celle-ci. Ces anticorps peuvent être monoclonaux ou polyclonaux.

Les anticorps contre les polypeptides tels que définis ci-dessus peuvent être préparés selon les techniques classiques bien connues de l'homme de métier (par exemple, Kohler et Milstein, 1975 ; Kozbor et al. 1983, Martineau et al., 1998). Un anticorps selon l'invention pourra comprendre un marqueur détectable isotopique ou non
10 isotopique, par exemple fluorescent, ou encore être couplé à une molécule telle que la biotine selon des techniques bien connues de l'homme de métier.

Un autre volet de l'invention a trait aux moyens de sélection formés par des sondes pour la détection de plantes résistantes à au moins un potyvirus, ces sondes étant prises en elles-mêmes. On définit dans ce volet des sondes pour la détection de
15 plantes résistantes à au moins un potyvirus.

Une première catégorie de sondes est caractérisée en ce que chaque sonde comprend au moins une séquence correspondant à tout ou partie des SEQ ID NO: 2, 4, 6, et 8. Au sein de cette première catégorie, les sondes comprenant au moins une
20 séquence correspondant à tout ou partie de SEQ ID NO: 2, 4, 6, et 8, et notamment à tout ou partie de la portion codant pour la région de la protéine eIF4E définie par la séquence générale (I) sont tout spécialement préférées.

SEQ ID NO: 6 est une sonde de sensibilité issue du piment Yolo Wonder. Elle se distingue de SEQ ID NO: 8, qui est une sonde de résistance issue du
25 piment Yolo Y, par deux bases nucléotidiques. Ces mutations montrées sur SEQ ID NO: 6 & 8, correspondent aux sites de restriction *TspRI* pour SEQ ID NO: 6 et *Mnvl* pour SEQ ID NO: 8, marquant respectivement la sensibilité aux potyvirus dans Yolo Wonder et la résistance aux potyvirus dans Yolo Y.

Ces sondes sont utilisées pour distinguer les plantes résistantes et
30 sensibles, soit par hybridation sélective et détection de la présence ou de l'absence d'un signal d'hybridation, soit par digestion par une enzyme de restriction appropriée capable de cliver différenciellement l'allèle de sensibilité et l'allèle de résistance, par exemple *EcoRI*, *TspRI*, ou *Mnvl* suivie de l'hybridation de la sonde avec le produit de restriction. La distinction entre les plantes sensibles et les plantes résistantes se fait dans ce dernier
35 cas par la différence de taille des fragments hybridés.

La présente invention fournit également des outils permettant de réaliser un autre procédé de sélection conforme au premier mode de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, tel que défini ci-dessus. Selon ce premier mode, une amplification par

PCR de la séquence *elF4E* est tout d'abord effectuée. L'amplification est suivie d'une digestion sélective par une enzyme de restriction. Les outils qui interviennent sont donc de deux types : enzyme(s) de restriction et amorce(s) PCR permettant d'amplifier la séquence *elF4E*.

- 5 La présente invention a notamment pour objet un kit permettant de détecter un allèle de *elF4E* associé à la résistance ou à la sensibilité aux potyvirus, caractérisée en ce qu'il comprend :

- au moins une enzyme de restriction choisie parmi :

- 10 a) une enzyme reconnaissant un site de restriction I présent dans au moins un allèle de *elF4E* associé à la sensibilité aux potyvirus, et absent des allèles de *elF4E* associés à la résistance aux potyvirus ;
- b) une enzyme reconnaissant un site de restriction II présent dans au moins un allèle de *elF4E* associé à la résistance aux potyvirus, et absent des allèles de *elF4E* associés à la sensibilité aux potyvirus ; et
- 15 - une paire d'amorces nucléotidiques permettant d'amplifier *elF4E* ou une portion de celui-ci comprenant le site de restriction I et/ou le site de restriction II.

Par exemple :

- pour détecter un allèle de *elF4E* associé à la sensibilité aux potyvirus, tel que celui représenté par la séquence SEQ ID NO: 6, l'enzyme de restriction est
- 20 *TspRI*, ou l'un de ses isochizomères, reconnaissant un site de restriction défini par la séquence sens: NNCASTGNN[^] et la séquence antisens [^]NNGTSACNN. Les amorces nucléotidiques sont choisies de manière à permettre l'amplification de la totalité de la séquence de *elF4E* ou d'au moins une portion de celle-ci comprenant le site *TspRI* ;
- 25 - pour détecter un allèle de *elF4E* associé à la résistance aux potyvirus, tel que celui représenté par la séquence SEQ ID NO: 8 l'enzyme de restriction est *MvnI*, ou l'un de ses isochizomères, reconnaissant un site de restriction défini par la séquence sens: CG[^]CG et la séquence antisens : GC[^]GC. Les amorces nucléotidiques sont choisies de manière à permettre l'amplification de la totalité
- 30 de la séquence de *elF4E* ou d'au moins une portion de celle-ci comprenant le site *MvnI* ;

Dans les deux cas on peut utiliser par exemple les amorces SEQ ID NO: 18 et SEQ ID NO: 19.

- 35 Comme indiqué ci-dessus, la détection de plantes sensibles ou résistantes aux potyvirus peut également s'effectuer par détection de la présence ou de l'absence de la forme sauvage ou mutante de la protéine *elF4E*.

Ainsi, la présente invention englobe l'utilisation d'une protéine eIF4E de type sauvage ou mutante, telles que définies ci-dessus, ou d'un anticorps spécifique d'une desdites protéines, pour la sélection de plantes résistantes aux potyvirus.

De préférence, ladite protéine eIF4E est choisie parmi :

- 5 - la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 3 ;
- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 5 ;
- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 7 ;
- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 9 ;
- 10 - le groupe de protéines représenté par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 22 ;
- le groupe de protéines représenté par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 23 ;

- Ainsi, une catégorie de moyens de détection de la résistance aux potyvirus conformes à l'invention est caractérisée en ce que chacun de ces moyens
- 15 comprend au moins un anticorps spécifique de tout ou partie d'une protéine eIF4E mutante conforme à l'invention, et notamment d'un fragment d'au moins 6 acides aminés de celle-ci portant une mutation associée à la résistance, telle que définie ci-dessus.

- Par exemple, un moyen de détection de la résistance peut être constitué par un anticorps spécifique de tout ou partie d'une séquence polypeptidique telle que
- 20 définie ci-dessus, notamment d'un fragment d'au moins 6 acides aminés de celle-ci portant une mutation associée à la résistance.

- L'invention concerne également des moyens de détection de la sensibilité ou de la résistance aux potyvirus, constituées chacun par au moins une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe comprenant les séquences suivantes :

- 25 - SEQ ID NO: 3 ;
- SEQ ID NO: 5 ;
- SEQ ID NO: 7 ;
- SEQ ID NO: 9 ;
- SEQ ID NO: 22 ;
- 30 - SEQ ID NO: 23 ;

- L'invention concerne plus particulièrement des moyens de détection de la sensibilité aux potyvirus, constitués chacun par au moins un anticorps spécifique d'une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe comprenant les séquences suivantes :

- 35 - SEQ ID NO: 3 ;
- SEQ ID NO: 5 ;
- SEQ ID NO: 7 ;
- SEQ ID NO: 9 ;
- SEQ ID NO: 22 ;

- SEQ ID NO: 23 ;

ou un fragment d'au moins 6 acides aminés de l'une desdites séquences, notamment un fragment de la région de celle-ci définie par la séquence (I).

5 De préférence, chaque sonde nucléotidique ou autre moyen de détection susvisé est pourvu d'au moins un marqueur, utile comme témoin de l'hybridation nucléotidique ou l'appariement antigène/anticorps au cœur de la détection de la séquence sensible. Avantagusement, ce marqueur est détectable par moyens spectroscopiques, photochimiques, biochimiques, immunochimiques ou encore chimiques. Par exemple un
10 tel marqueur peut consister en un isotope radioactif de ^{32}P , ^3H , en une molécule fluorescente (5-bromodésoxyuridine, fluorescéine, acétylaminofluorène) ou encore en un ligand tel que la biotine. Concernant plus spécialement les sondes nucléotidiques, leur marquage est fait de préférence par incorporation de molécules marquées au sein des polynucléotides par extension d'amorces ou bien par ajout sur les extrémités 3' ou 5'.

15 De manière préférentielle, les séquences utilisées pour détecter les plantes résistantes aux potyvirus sont utilisées en tant que sondes ou amorces nucléotidiques.

Il va de soi que tous les moyens de détection susvisés ne sont pas limités strictement aux séquences désignées, mais englobent tous les équivalents constitués
20 notamment par les séquences similaires conservant la fonction concernée et telles que définies ci-dessus.

L'homme du métier connaît parfaitement les différentes méthodes de préparation de sondes et d'amorces, y compris par clonage et par l'action d'enzymes de restriction, ou encore par synthèse chimique directe selon des techniques telles que la
25 méthode au phosphodiester de Brown et al. (1979) ou la technique de support solide décrite dans le brevet européen N° EP 0707592. Les acides nucléiques peuvent être marqués, si désiré, en incorporant une molécule ou un marqueur détectable comme exposé ci-dessus. Des exemples de marquage non radioactifs de fragments d'acides nucléiques sont décrits notamment dans le brevet français N° FR 78 10 975 ou encore dans les
30 articles de Urdéa et al., (1988) ou Sanchez-Pescador et al. (1988).

Selon un autre de ses aspects, la présente invention concerne l'utilisation des moyens de détection définis ci-dessus pour la détection de plantes résistantes/sensibles à au moins un potyvirus.

Conformément à l'invention, on met en œuvre en tant que repère(s)
35 oligonucléotidique(s) de résistance/sensibilité aux potyvirus, les sites de restriction *MvnI* et/ou *TspRI*, au demeurant connus, des séquences *eIF4E*.

De préférence, les sites de restriction utilisés comme repère(s) oligonucléotidique(s) correspondent :

- à la séquence sens : CG[^]CG et à la séquence antisens : GC[^]GC
- et/ou à la séquence sens: NNCASTGNN[^] et à la séquence antisens :
^NNGTSACNN.

L'exploitation de ces sites de restriction comme repères (ou marques ou
5 étiquettes) de résistance aux potyvirus sur des séquences exprimées, est à rapprocher du premier mode de mise en œuvre du procédé de détection sus-décrit, dans lequel on a recours à des enzymes de restriction (par exemple : *MvnI* et/ou *TspRI*) et à des amorces d'amplification de la séquence *eIF4E* , par exemple :SEQ ID NO 18 et/ou 19.

Eu égard à la spécificité des sites de restriction *MvnI* & *TspRI*, la
10 présente invention englobe également l'utilisation comme repère(s) oligonucléotidique(s) de résistance/sensibilité aux potyvirus, des susdits sites de restriction *MvnI* & *TspRI*, et, de préférence, du site de restriction correspondant à la séquence sens : CG[^]CG et à la séquence antisens : GC[^]GC et/ou du site de restriction correspondant à la séquence sens: NNCASTGNN[^] et à la séquence antisens : ^NNGTSACNN.

15 Selon encore un autre de ses aspects, la présente invention concerne un kit de sélection de plantes résistantes/ sensibles aux potyvirus comprenant au moins un moyen de détection de type anticorps ou polymucléotide tels que définis *supra*. Le kit comprend le cas échéant les réactifs nécessaires à la réalisation d'une réaction d'hybridation ou d'amplification.

20 L'invention a également pour objet les plantes issues du procédé ci-dessus décrit et/ou de la mise en œuvre des outils et/ou de l'utilisation et/ou du kit de sélection définis ci-dessus. De préférence, ces plantes appartiennent à la famille des solanacées, des cucurbitacées, des crucifères et des composées. De manière encore plus préférée, elles sont choisies parmi les tomates, piments et/ou la laitue.

25 A titre d'exemple, les inventeurs réalisent le procédé objet de l'invention en suivant le protocole d'analyse RFLP (polymorphisme de longueur de fragments de restriction). Pour ce faire, les inventeurs ont utilisés un protocole classique de RFLP dans lequel les sondes objets de l'invention sont marquées au ³²P et dans lequel l'ADN des plantes de piment à analyser est digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI*. A l'issue de ce
30 procédé, les inventeurs obtiennent des profils d'hybridation différents entre les plantes résistantes aux potyvirus et les plantes sensibles, permettant ainsi de sélectionner les plantes sensibles ou résistantes. Ces dernières pourront ensuite entrer dans un programme d'amélioration des plantes par croisements successifs.

L'invention ne concerne pas seulement la sélection de plantes résistantes
35 ou sensibles aux potyvirus. En effet, dans la mesure où les inventeurs ont pu identifier le gène *eIF4E* déterminant une résistance récessive aux potyvirus, il est désormais envisageable d'obtenir de nouvelles variétés de plantes génétiquement modifiées, résistantes (ou sensibles) à au moins un potyvirus.

L'invention concerne donc un procédé non biologique d'obtention de nouvelles variétés de plantes génétiquement modifiées, résistantes (ou sensibles) à au moins un potyvirus, caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à faire en sorte qu'apparaisse et/ou à introduire un allèle de *eIF4E* associé à la résistance (ou à la sensibilité) audit potyvirus dans le génome de ces plantes.

Selon un mode avantageux de mise en œuvre de ce procédé, l'apparition de l'allèle de résistance est provoquée par la mise en œuvre d'une méthode sélectionnée dans le groupe comprenant :

- mutagenèse, avantageusement "Tilling",
- recombinaison homologue,
- surexpression,
- insertion/délétion,
- "gene silencing" / transgénèse,
- et leurs combinaisons.

Les outils susceptibles d'être mis en œuvre dans le susdit procédé non biologique d'obtention font également partie intégrante de la présente invention.

La présente invention a ainsi pour objet toute unité génétique construite comprenant un polynucléotide conforme à l'invention codant pour une protéine *eIF4E* mutante, placé sous contrôle d'éléments appropriés de contrôle de la transcription, et éventuellement de la traduction.

Ladite protéine *eIF4E* mutante peut avantageusement être choisie parmi les variants des séquences SEQ ID NO: 22 ou 23 associés à la résistance aux potyvirus.

La présente invention a aussi pour objet toute unité génétique construite caractérisée en ce qu'elle comprend :

- au moins un outil génétique A/ et/ou B/ tel que défini supra,
- et/ou au moins une séquence nucléotidique choisie dans le groupe comprenant tout ou partie des séquences suivantes :
 - SEQ ID NO: 6
 - SEQ ID NO: 8
- et/ou au moins une séquence nucléotidique codant pour facteur *eIF4E* et comprenant au moins un site de restriction *MvnI*, et/ou *TspRI*, et, de préférence, au moins un site de restriction correspondant à la séquence sens : CG^CG et à la séquence antisens : GC^GC et/ou un site de restriction correspondant à la séquence sens : NNCASTGNN^ et à la séquence antisens : ^NNGTSACNN.

Un autre outil de transformation génétique couvert par l'invention est constitué par tout vecteur de transformation de cellules végétales comportant au moins une unité génétique construite telle que visée ci-dessus. Il peut s'agir de tout vecteur de clonage connu et approprié (phages / plasmides / cosmides.....).

Les cellules végétales et les microorganismes transformés au moyen d'au moins un vecteur ou d'au moins une unité génétique construite tels que définis supra, sont également visées par l'invention.

- A un niveau supérieur, l'invention englobe les plantes transformées au moyen d'au moins un vecteur et/ou d'au moins une unité génétique construite et/ou de cellules végétales transformées et/ou de microorganismes transformés, tels qu'ils ont été décrits ci-dessus.

L'homme du métier connaît bien toutes les techniques directes ou indirectes de modification génétique. Des détails complémentaires sont donnés dans les exemples qui suivent.

DESCRIPTION DES FIGURES

- La Figure 1 représente le gel issu d'une analyse par southern blot et montrant les différences de profils du marqueur *elF4E* de résistance aux potyvirus, observées pour différents piments sensibles ou résistants. L'ADN génomique de piment est digéré par l'enzyme *EcoRI* et hybridé avec le cDNA *elF4E* de tabac – SEQ ID NO: 2 – (exemple 3).
- La Figure 2 représente le gel montrant les amplifications PCR du gène *elF4E* impliqué dans la résistance aux potyvirus chez le piment et met en évidence un site de restriction *MvaI* différentiel entre sensible et résistant. (exemple 4).
- La Figure 3 représente l'alignement de la séquence protéique de *elF4E* de différentes variétés de piment, sensibles ou résistantes aux potyvirus.
- La Figure 4 représente l'alignement de la séquence protéique de *elF4E* de différentes variétés de tomate, sensibles ou résistantes aux potyvirus.

EXEMPLES :

Exemple 1 : Obtention des sondes tomate et piment

Les cDNA de tomate et de piment ont été obtenus par la technique de 3' et 5' RACE (System for Rapid Amplification of cDNA Ends commercialisé par la société Invitrogen™) à partir de l'extraction d'ARN total de tomate et de piment et à l'aide d'amorces dégénérées définies sur un alignement des séquences de *elF4E* de tabac, tomate et *Arabidopsis*. La partie 3' du cDNA a été clonée par 3'RACE. Des amorces définies entre le TAG et la queue polyA des séquences obtenues par 3'RACE ont été utilisées pour obtenir les cDNA complets par 5' RACE.

Amorces utilisées pour les deux étapes de la 3' RACE :

- Etape 1 : TCTAGATACAAYAATATCCAYCACCCAAGCAA = SEQ ID NO: 10
Etape 2 : TCTAGATGGGRCGAGACTTTTCAYTGTTT = SEQ ID NO: 11

Les amorces utilisées pour les trois étapes de la 5'RACE sont illustrées par le Tableau I ci-après:

TABLEAU 1

	Piment	Tomate
Etape 1	GTA TGA GAA ACT AAA CTA = SEQ ID NO: 12	AAA TGA GAA ACT AAA CTA = SEQ ID NO: 15
Etape 2	CAA CTT TTC AGT ACG AAT TGT GTT T = SEQ ID NO: 13	CTT TCC AGT ACG AAT TGT GTT TCT T = SEQ ID NO: 16
Etape 3	TCC GAC ATT GCA TCA AGA ATT ATA C = SEQ ID NO: 14	CTG CAT CAA GAA CTA TAC GGT GTA A = SEQ ID NO: 17

Exemple 2 : Test d'hybridation et de sélection des plantes résistantes aux potyvirus (résistance contrôlée par le locus *pvr2/pvr1/pvr5*)

Extraction de l'ADN des plantes à analyser

- 5 L'extraction de l'ADN des plantes (Solanacées, Cucurbitacées, Crucifères et Composées) suit les protocole d'extraction standard basée sur le protocole de micro-extraction d'ADN de Fulton et Tanksley, 1995

Digestion de l'ADN et séparation sur gel d'agarose

- Le protocole suivi utilise 2,5U d'enzyme / μg d'ADN. Le volume enzymatique doit être inférieur à 10% du volume réactionnel. Le volume réactionnel est calculé en fonction de la taille du puits : il dépend du type de cuve et de peigne utilisés et du volume du gel (300ml en général). Le volume du tampon spécifique de l'enzyme et de spermidine doivent représenter chacun 10% du volume réactionnel :

- x μl ADN
- 15 - 1X tampon
- 1X spermidine (4 mM)
- 2.5 U d'enzyme / μg d'ADN
- qsp H_2O volume réactionnel

- La digestion est réalisée à 37°C toute la nuit. En parallèle, sont préparés
- 20 des échantillons de phages λ digérés par *Hind III* : 0,5 μg / puits. Après digestion, la bonne digestion des ADN est vérifiée sur gel d'agarose 1%, TAE 1X avec 1 μl de produit de digestion. Si la digestion est correcte, le tampon de charge est alors ajouté. Le tampon de charge doit représenter au minimum 10% du volume total (ou 20%). Le dépôt est alors effectué sur un gel de 300ml, NEB 1X, 1% d'agarose contenant 10 μl de BET. La
- 25 migration se fait à 25V pendant 24h dans du tampon NEB 1X (arrêt de la migration à 2 cm du bord du gel).

Transfert sur membrane de nylon

- Une membrane Hybond N+ et 1 papier Wattman à la taille du gel sont découpés. Dans une cuve plate contenant 1L HCl 0,25N, le gel est mis à tremper 30 min.
- 30 sous agitation (le bleu devient jaune).

Pendant ce temps, le blotteur est préparé en :

- mouillant une feuille de papier Wattman dans du SSC 2X et en la plaçant sur la plaque poreuse du blotteur.
- puis en mouillant la membrane et en la plaçant sur le Wattman qui sera recouvert par le cache plastique.

5

Le gel est rincé dans une cuve contenant de l'H₂O distillée, puis placé sur le cache du blotteur en évitant les bulles et en vérifiant l'étanchéité du système. Le blotteur est mis en route à 50 mb max. Un peu de soude 0,4N est versée sur le gel. Deux éponges imbibées de soude sont placées sur le gel qui sera recouvert de soude jusqu'à saturation.

10

Le transfert s'effectue en 2h à 3h. Les membranes sont rincées dans un bain de SSC 2X durant 10 à 15 min puis séchées à l'air libre et cuites 2h à 80°C.

Préparation des sondes

- La préparation des sondes par marquage PCR au ³²P concerne des sondes de 3 kb maximum, amplifiées par PCR ou directement sur plasmides, permettant de révéler les bandes majeures pour une sonde, de concentration entre 1 et 5 ng/μl.

Les conditions de réaction sont résumées dans le tableau 2 ci-après

TABLEAU 2

	Concentration finale
H ₂ O	25,6 μl
Tp Promega 10 X	4 μl 1X
MgCl ₂ Promega	2,4 μl
Mix (ATG 50 μM+dCTP 5μM)*	2 μl ATG 2,5μM ; dCTP 0,25 μM
Taq 2U/μl	1 μl
Primer (5pM)	1 μl
α32P-dCTP (1000Ci/mmmole, 10μCi/μl)	3 μl
ADN sonde	1 μl
Volume réactionnel final	40 μl

* : Mix (ATG 50μM+dCTP5μM) pour marquage des sondes RFLP par PCR.

- 20 Dilution de dATP, dTTP, dGTP à 10 mM, à partir des solutions mères à 100mM :

- 5 μl dNTP à 100mM
- 45μl H₂O

Dilution de dCTP à 1 mM, à partir de la solution mère à 100 mM :

- 0,5μl dCTP à 100 mM
- 25 - 49,5 μl H₂O

Mix ATG + dCTP :

- 2,5 μl dATP à 10 mM concentration finale : 50μM
- 2,5 μl dTTP à 10 mM concentration finale : 50μM
- 2,5 μl dGTP à 10 mM concentration finale : 50μM

- 2,5 µl dCTP à 1 mM concentration finale : 5µM
- 490 µl H₂O

Le marquage des sondes se fait au cours de 30 cycles PCR de :

- 30 s à 94°C
- 5 - 45 s à 52 °C
- 1 min 30 à 72 °C

Une fois marquées, les sondes sont ensuite dénaturées selon le protocole suivant :

- ajouter chaque sonde dans un tube contenant 160 µl de NaOH 0,8 N + 2 à 5 µl de
- 10 Lambda marqué (par random priming)
- incubé 5 min
- neutraliser avec 200 µl de Tris HCl 1M

Hybridation

Protocole d'après Church et Gilbert, (1984)

15 a- Préhybridation à 65°C toute la nuit

On utilise 20 ml de tampon d'hybridation* par tube pour 2 à 6 demi blots. 25 ml de tampon au delà, sans dépasser 10 demi blots par tube. Les membranes sont humidifiées dans une boîte contenant du tampon d'hybridation avant d'être légèrement égouttées puis roulées (toutes ensemble) et mises dans le tube.

- 20 Vérifier pendant la préhybridation que les tubes sont étanches et que les membranes se déroulent bien, sinon les changer de sens.

*composition du tampon de pré-hybridation et d'hybridation :

Pour 500 mL : 21,91 g NaCl; 18,38 g Na Citrate; 380 mL H₂O; 15 mL SDS 20%; 25 mL NaPO₄ 1M pH 7,5; 25 mL Denhardt 100X; 5 mL EDTA 0,25M; 50 mL

- 25 Dextran sulfate 50%.

b- Hybridation à 65°C au moins 16 heures

On laisse décroître la température des tubes avant de les ouvrir pour éviter de mouiller le pas de vis. On ajoute la sonde dénaturée (5 min dans NaOH 0,8 M puis arrêt de la dénaturation Tris-HCl 1M). Dans ces conditions, l'hybridation peut durer

- 30 48 ou 72 heures.

c- Lavages

Les boîtes (ou bacs) sont lavées dans un large excès de tampon (1% SDS (Serva) 40mM NaPi préchauffé à 65°C. Pour environ 5-10 demi membranes :

- 1 lavage de 20 min. à 65°C sous agitation. Pour laver, transférer membrane par
- 35 membrane dans un nouveau bac contenant le tampon préchauffé. Les tampons de

lavage radioactifs (au moins les 2 premiers) sont versés dans un bidon prévu à cet effet.

- 1 rinçage de 2-3 min. dans un tampon neuf chauffé à 65°C.

d- Exposition

- 5 Les membranes sont essorées sur un lit de papier absorbant constitué d'un champ de papier bleu recouvert de papier blanc type rouleau de Tork ; elles ne doivent pas sécher. Elles sont ensuite mises dans des pochettes plastiques pour l'exposition, placées dans une cassette avec l'écran intensificateur.

- 10 Selon le signal mesuré au compteur Geiger, elles sont exposées à -80°C de une nuit à quelques jours.

e- Déshybridation des membranes avant réhybridation

- Les membranes sont déshybridées dans une solution 0,1% SDS 1 mM EDTA chauffée à 80°C (1 litre pour 40 demi-membranes) pendant 20 min à température ambiante. Les membranes sont ensuite rincées 10 min. dans une solution 2X SSC. Enfin, 15 les membranes sont essorées puis stockées humides dans des pochettes en plastique à 4°C.

Exemple 3 : Corrélation entre la résistance aux potyvirus et *elf4E*

- Le matériel viral employé dans ces tests d'infection sont les isolats N-605 du PVY obtenus à partir de *Solanum tuberosum* (Jakab *et al.*, 1997), ou PVY-LYE84, ou PVY-LYE240r pour la tomate (Légnani *et al.*, 1995) et les isolats PVY-To72, PVY-Si15 pour le piment (Dogimont *et al.*, 1996) ainsi que l'isolat CAA-10 du TEV (Légnani *et al.*, 1996). Le même protocole est utilisé pour tous les autres isolats de PVY et de TEV qui sont contrôlés par les locus *pvr2/pvr1/pvr5* et/ou *pot-1*. Les isolats sont maintenus selon la procédure Bos (Bos, 1969) et multipliés sur des plants de *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthii* avant inoculation des plantes de tomate ou de piment au stade cotylédons à deux 25 feuilles étalées. L'inoculum viral est préparé comme décrit dans les articles de Légnani *et al.* (1995, 1996) et de Dogimont *et al.* (1996). Les cotylédons et les deux premières feuilles des plantes sont inoculés mécaniquement. Les lignées sont évaluées sous conditions contrôlées en chambre de culture (14 heures de jour, 18°C nuit et 24°C jour) pour suivre leur réaction après inoculation. 4 semaines après inoculation, toutes les plantes 30 sont évaluées individuellement pour la présence ou l'absence de l'antigène de capsid du PVY ou du TEV par test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) comme décrit par Légnani *et al.*, (1995, 1996) et Dogimont *et al.* (1996). D'autres protocoles parfaitement connus de l'homme du métier peuvent également être utilisés pour l'inoculation mécanique de potyvirus aux plantes.

- 35 Le gel présenté en Figure 1 annexée montre la différence de profils observée entre le marqueur *elf4E* et la résistance aux potyvirus contrôlée par le locus

pvr2. Cette co-ségrégation complète entre la résistance aux potyvirus et une copie du gène *elf4E* a été observée sur une descendance en ségrégation de plus de 500 plantes.

L'ADN génomique de piment est digéré par l'enzyme *EcoRI* et hybridé avec le cDNA *elf4E* de tabac - SEQ ID NO: 2 - (les mêmes profils RFLP sont obtenus par hybridation avec le cDNA de tomate ou le cDNA de piment).

Les plantes sensibles (S) possèdent le fragment de restriction à 7 kb "bas" alors que les plantes résistantes (R) possèdent les fragments de restriction à 7 kb "haut". Les plantes hétérozygotes (Ht) présentent les deux fragment de restriction et sont sensibles (car gène récessif).

Exemple 4 : Mise en évidence de mutations de *elf4E* associées à la résistance aux potyvirus

1) Mise en évidence de sites de restriction différentiels entre les copies de d'un génotype de piment sensible aux potyvirus et d'un génotype résistant.

Par les techniques de séquençage classique, des mutations ponctuelles entre le gène *elf4E* de la variété de piment "Yolo Wonder" (sensible au potyvirus et porteuse de l'allèle *pvr2*¹) et celui de la variété de piment "Yolo Y" (résistant aux potyvirus et porteur de l'allèle *pvr2*¹) ont été mises en évidence. Ainsi, en position 200, la séquence SEQ ID NO: 6 codante du *elf4E* dans Yolo Wonder présente un T tandis que la séquence SEQ ID NO: 8 codante du *elf4E* dans Yolo Y présente un A. De la même façon en position 236, la séquence codante de Yolo Wonder présente un T tandis que la séquence codante de Yolo Y présente un G.

La première mutation ponctuelle correspond à un site de restriction *TspRI* (ou ses isoschizomères) existant uniquement chez Yolo Wonder. Ce site de restriction différentiel a été validé par PCR sur le cDNA de Yolo Wonder et Yolo Y: définition d'amorces en 5' et en 3' du cDNA et digestion de l'amplifiat PCR par l'enzyme *TspRI*.

(Même protocole que ci-dessous pour l'enzyme *MvnI* sauf que la digestion se fait à 70°C pour cette enzyme).

La seconde mutation ponctuelle correspond à un site de restriction *MvnI* (ou ses isoschizomères) existant uniquement chez Yolo Y. Ce site de restriction différentiel a été validé par PCR sur le cDNA de Yolo Wonder et Yolo Y: définition d'amorces en 5' et en 3' du cDNA et digestion de l'amplifiat PCR par l'enzyme *MvnI*.

Réaction de PCR sur le cDNA :

Amorce sens : AAA AGC ACA CAG CAC CAA CA = SEQ ID NO: 18

Amorce antisens : TAT TCC GAC ATT GCA TCA AGA A = SEQ ID NO: 19

Les conditions de réaction sont illustrées par le tableau 3 ci-après.

TABLEAU 3

	Concentration finale
H ₂ O	13.05 µl
Tp Promega 10 X	2.5 µl 1X
MgCl ₂ Promega	2.0 µl
dNTP (4 µM @)	1.25 µl
Taq 2U/µl	1 µl
Primer (10 pM)	1.5 de chaque µl
cDNA (10 ng/µl)	3 µl
Volume réactionnel final	25 µl
Cycles d'amplification : 93°C-3 min/35 X (93°C-45 s/53°C-1 min/72°C-2 min)/72°C-10 min	

Digestion par l'enzyme *MvnI* : 8 µl de produit PCR + 2 U d'enzyme + 1,3 µl de tampon de l'enzyme + 13,5 µl H₂O 2h à 37°C. Migration sur gel d'agarose 1,2% TAE 1X.

- 5 Le gel présenté en Figure 2 annexée montre les amplifications PCR du gène *elF4E* impliqué dans la résistance aux potyvirus chez le piment et met en évidence un site de restriction *MvnI* différentiel entre sensible et résistant.

Bandel :

- amplifiât PCR du gène *elF4E* du piment Yolo Wonder sensible (S) au potyvirus - allèle *pvr2+* -
- et absence de digestion enzymatique par *MvnI*.

Bande 2 :

- amplifiât PCR du gène *elF4E* du piment Yolo Y résistant (R) au potyvirus - allèle *pvr2¹*
- et mise en évidence du site de restriction *MvnI*.

Bande 3 :

- Marqueur de taille 1 kb ladder.

2) Mise en évidence de mutations de *elF4E* associées à la résistance aux potyvirus.

- 20 Le séquençage du gène *elF4E* de différentes variétés de piment sensibles ou résistantes aux potyvirus a fait apparaître des mutations, associées à la résistance aux potyvirus, dans la même région de *elF4E*.

L'alignement de la séquence protéique de *elF4E* de ces différentes variétés est représenté sur la Figure 3.

Légende de la figure 3 :

- 25 YW = Yolo Wonder S / *pvr2⁺*
 DDL = Doux Long des Landes S / *pvr2⁺*
 PM1008 = Résistant au PVY(0)
 YY = Yolo Y / *pvr2¹*
 Avelar = allèle *pvr2¹*
 30 Vania = allèle *pvr2¹*
 PM994 = Résistant au PVY(0)
 Florida VR2 = Florida / *pvr2²*

C69 = lignée HD issue de l'hybride F1 entre CM334 et Yolo Wonder / pvr5

CM334 = Criollo de Morelos 334 / pvr5

PM1014 = Résistant au PVY(0)

Per = Perennial / résistance partielle (QTL) au locus pvr2

- 5 Souligné gras = mutation commune à tous les résistants sauf PM1008

Surligné gris = mutation spécifique à l'allèle pvr2¹

Gras non souligné = mutation spécifique à l'allèle pvr2²

Souligné non gras = mutation spécifique à l'allèle pvr5

Surligné noir = mutation spécifique au génotype PM1008.

- 10 Ces différents variants sont également représentés dans la séquence SEQ ID NO: 22

Exemple 5 : Mise en évidence de la synténie entre piment et tomate pour les gènes récessifs de résistance aux potyvirus (gène pot-1 chez la tomate et locus pvr2 chez le piment)

Cinq gènes majeurs et plusieurs QTL impliqués dans la résistance aux

- 15 potyvirus sont cartographiés sur le génome du piment. Grâce à l'utilisation de sondes RFLP communes pour cartographier le génome et grâce à la forte conservation de l'ordre des marqueurs entre le génome de la tomate et celui du piment, les facteurs de résistance aux potyvirus du piment sont placés sur la carte de la tomate. La localisation des loci de résistance aux potyvirus du piment sur les chromosomes de tomate ainsi que celle des
- 20 marqueurs RFLP liés est récapitulée dans le tableau 4 avec les références d'origine. Dans l'objectif d'établir précisément la correspondance entre les régions génomiques du piment et de la tomate avec les gènes de résistance aux potyvirus, les marqueurs RFLP TG135 et Cab3 sont ajoutés à la carte pré-existante de liaison génétique du piment (Lefebvre et al, soumis).

25

TABLEAU 4.

Gène	Spectre	Marqueurs liés ^b	Position chromosomique chez la tomate	Référence
<i>pvr1</i>	TEV, PepMoV ^a	TG56, TG135	3	Murphy <i>et al.</i> 1998
<i>pvr2</i>	PVY, TEV ^a	CT31, TG132	3	Caranta <i>et al.</i> 1997 Caranta <i>et al.</i> , unpublished
<i>pvr3</i>	PepMoV ^a	nd ^c	nd ^c	Murphy <i>et al.</i> 1998
<i>Pvr4</i>	PVY, PepMoV	CD72, CT124	10	Caranta <i>et al.</i> 1999 Grube <i>et al.</i> 2000
<i>pvr5</i>	PVY ^a	CT31	3	Caranta <i>et al.</i> , unpublished
<i>pvr6</i>	PVMV	TG57	9	Caranta <i>et al.</i> 1996
<i>pvr7</i>	PepMoV, PVY ^a	CD72, CT124	10	Grube <i>et al.</i> 2000

^a seul le spectre général de résistance est indiqué pour chaque gène, certains de ces gènes de résistance peuvent être détournés par des souches virulentes.

^b les marqueurs RFLP sont obtenus en utilisant au hasard d'ADN génomique de tomate (TG) ou des sondes ADNc d'épiderme de feuille de tomate (CD and CT).

^c nd = non déterminé

a- Marquage AFLP et RFLP du gène *pot-1*

- 5 L'ADN total est extrait à partir d'environ 1 g de feuilles fraîches de plantes F2 (Caranta *et al.*, 1997).

Les échantillons d'ADN de 6 plantes F2 (issues de l'autofécondation de l'hybride F1 entre *Lycopersicon esculentum* Mospomoris et *L. hirsutum* PI247087) (*pot-1*⁺/*pot-1*⁻) ayant généré des familles F3 complètement sensibles au PVY souche N 605 et les échantillons d'ADN de 9 plantes F2 ayant généré des familles F3 complètement résistantes au potyvirus sont groupés pour une analyse ségrégeante en masse (bulkéd segregant analysis) et pour un étiquetage AFLP de *pot-1*.

- Les marqueurs AFLP sont générés selon le protocole de Vos *et al.* (1995) avec les enzymes de restrictions *EcoRI*, *HindIII*, et *MseI*. La première amplification est réalisée en utilisant une combinaison d'amorces avec un seul nucléotide sélectif et une seconde combinaison avec 3 nucléotides sélectifs.

- Les marqueurs AFLP liés à *pot-1* sont cartographiés sur les lignées d'introgession de *L. hirsutum* dans *L. esculentum* (Montfort and Tanksley, 2001) afin d'assigner *pot-1* à un chromosome de la tomate.

- 20 L'assignation est validée par la cartographie de marqueurs RFLP localisés sur le chromosome cible. La procédure RFLP est décrite par Saliba-Colombani *et al.* (2000). Le criblage du polymorphisme entre *Lycopersicon esculentum* Mospomoris (sensible aux potyvirus) et *L. hirsutum* PI247087 (résistant aux potyvirus) est réalisé avec 3 enzymes de restrictions (*EcoRI*, *HindIII* et *XbaI*) et des marqueurs RFLP préalablement cartographiés chez la tomate (CT, ADNc de tomate dérivé de l'ARNm de tissu épidermique de tomate, TG, clones d'ADN génomique de tomate ; la sonde CAB3 codant pour un polypeptide lié à la chlorophylle a et b, Tanksley *et al.*, 1992) Ce criblage permet de cartographier des marqueurs supplémentaires sur le chromosome 3.

- L'analyse de ségrégation pour les marqueurs moléculaires (AFLP, RFLP) et pour les données de résistance sont analysés par le logiciel Mapmaker/Exp v. 3.0 avec un Lod minimum de 4.0 et un pourcentage de recombinaison maximum de 0,3. Le pourcentage de recombinaison est alors converti en distance de cartographie en centiMorgans (cM) en utilisant la fonction de cartographie Kosambi (Kosambi, 1944).

- Ces résultats ont permis de localiser le gène *pot-1* de résistance au PVY chez la tomate sur le chromosome 3 et de montrer que ce gène est encadré par les mêmes marqueurs RFLP que le locus *pvr2* chez le piment.

b- Cartographie de *eIF4E* chez la tomate

En parallèle, le cDNA *eIF4E* de tomate a été cartographié par la méthode RFLP décrite précédemment sur les lignées d'introgession de *L. pennellii* dans *L. esculentum* (Eshed and Zamir, 1995). Ce travail a permis de localiser 5 copies du gène *eIF4E* chez la tomate. Une de ces copies a été localisée sur le chromosome 3, dans la même région génomique que le gène *pot-1* confirmant ainsi la synténie entre piment et tomate pour la résistance aux potyvirus et par conséquent la possibilité d'utiliser *eIF4E* comme marqueurs et outils de sélection de la résistance.

Cette mise en évidence de synténie entre le piment et la tomate pour les gènes récessifs de résistance aux potyvirus permet de dire que si *eIF4E* est le gène de résistance chez le piment, alors *eIF4E* est également le gène de résistance chez la tomate.

c-Clonage d'un gène *eIF4E* de tomate associé à la résistance aux potyvirus.

Selon la méthode 3' et 5' RACE PCR décrite dans l'exemple 1, l'ADNc d'un gène *eIF4E* de tomate similaire à celui isolé chez le piment a été isolé et cloné chez la tomate ; ce gène a été dénommé *eIF4E-2*.

La séquence codante de ce gène (variété 'Mospomorist' de *L. Esculentum*, sensible au PVY et au TEV) est représentée dans la liste de séquences sous le numéro SEQ ID NO: 2.

Par des techniques de séquençage classique, des mutations ponctuelles entre le gène *eIF4E-2* des génotypes de tomate *L. esculentum* 'Mospomorist' et *L. hirsutum* PI134417 (sensibles aux PVY et au TEV) et celui du génotype *L. hirsutum* PI247087 (résistant au PVY et au TEV, résistance contrôlée par le gène récessif *pot-1*) ont été mises en évidence.

L'alignement de séquences est représenté sur la Figure 4.

Légende : Mospo=Mospomorist; PI13=PI134417; PI24=PI247087

En gras et souligné : mutation observée seulement chez PI247087 ; En gras non souligné : mutation interspécifique entre *L. esculentum* et *L. hirsutum*.

La protéine *eIF4E* de *L. hirsutum* PI134417 et celle de *L. hirsutum* PI247087 sont également représentées par la séquence SEQ ID NO: 23

Exemple 6 : Criblage de la banque BAC du génome du piment avec des amorces définies sur la séquence codante *eIF4E* du génotype Yolo Wonder, démonstration de la co-ségrégation avec la résistance et détermination de la structure génomique du gène *eIF4E* qui co-ségrège avec *pvr2*.

Une banque BAC de piment a été construite à partir d'une lignée haploïde doublée HD208 issue de l'hybride F1 d'un croisement entre *Capsicum annum* Yolo Wonder et *C. annum* Perennial. HD208 contient l'allèle dominant de sensibilité *pvr2+*.

L'ADN de haut poids moléculaire a été extrait selon la méthode décrite dans <http://www.ncgr.org/research/jag/papers00/paper300/indexpage300.html>. L'ADN a ensuite été digéré partiellement et séparément par trois enzymes de restriction (*EcoRI*, *BamHI* et *HindIII*) afin d'augmenter la représentativité de l'ensemble du génome. L'ADN digéré a été cloné dans le vecteur pCUGIBAC1.

La banque BAC de piment est constituée de 239 232 clones avec une taille moyenne d'insert de 125kb ce qui correspond à une représentativité théorique de 10 équivalents génome (taille du génome du piment 3000 Mpb). Cette banque BAC a été organisée en 623 pools d'ADN en vue d'un criblage par PCR (1 pool correspond au mélange d'ADN de 384 clones).

Les amorces suivantes ont été définies sur la séquence codante de *eIF4E* de Yolo Wonder :

- Pim1 : 5' AGA CTT TCA TTG TTT CAA GCA TAA 3' = SEQ ID NO: 20
- Pim4 : 5' GAT TAG AAA GTG CAA ACA CCA ATA C 3' = SEQ ID NO: 21

Ce couple d'amorces amplifie sur le cDNA une bande de 493 pb et sur l'ADN génomique de HD208 une bande de 1800 pb. Ce couple d'amorces a été utilisé pour cribler la banque BAC de piment. Quatre clones BAC ont été identifiés portant la bande de 1800 pb (Clones 27-BI, 5-2H, 111-4H et 184-4H).

Ces quatre clones BAC ont été digérés par *EcoRI* et les profils de restriction montrent qu'ils sont chevauchants et correspondent donc bien à un même locus. Tous les clones BAC révèlent une bande *EcoRI* de 7 kb qui a été clonée dans un vecteur pGEM3Zf. Cette bande de 7kb, obtenue par digestion *EcoRI* correspond à celle qui co-ségrège avec la sensibilité aux potyvirus (voir exemple 3)

(1 = clone 27-BI ; 2 = clone 5-2H ; 3 = clone 111-4H ; 4 = clone 184-4H)

La présence de l'amplifiat de 1800 pb dans ce fragment de 7 kb confirme que ces quatre clones BAC portent le gène *eIF4E* correspondant au cDNA cloné. Le séquençage de cet insert de 7 kb a permis de définir la taille du gène qui est de 5500 pb et de définir la structure exon/intron : 5 exons et 4 introns.

Exemple 7 : Expérience d'expression transitoire du cDNA *eIF4E* de Yolo Wonder dans un génotype de piment résistant (porteur de l'allèle *pvr21*) pour validation du rôle de *eIF4E* dans la sensibilité aux Potyvirus.

Afin de valider l'hypothèse que l'allèle de sensibilité *pvr2+* correspond au gène *eIF4E* de Yolo Wonder, des expériences d'expression transitoire du cDNA *eIF4E* de Yolo Wonder via un vecteur viral PVX (Potato Virus X) (Chapman et al., 1992) sont réalisées sur un génotype résistant Yolo Y, porteur de l'allèle *pvr2*¹.

Le cDNA *eIF4E* issu du génotype sensible Yolo Wonder est cloné de manière orientée dans un vecteur d'expression PVX-CES-35S au site de clonage *Clal* et *SalI*.

Le génotype résistant (porteur de l'allèle pvr2¹) Yolo Y est co-inoculé avec ce plasmide recombinant et avec le pathotype 0 du Potato Virus Y (PVY). L'expression transitoire du gène *elF4E* issu du génotype sensible Yolo Wonder via le vecteur PVX recombinant permet au PVY de se multiplier dans le génotype résistant. Le PVY est détecté par la méthode ELISA ou RT-PCR (Legnani et al., 1995, 1996, Dogimont et al., 1996).

Les deux génotypes de *C. annuum* Yolo Wonder et Yolo Y ayant reçu le plasmide recombinant sont sensibles au PVY : on détecte le virus par ELISA et RT-PCR sur feuilles inoculées et feuilles systémiques 10 jours après inoculation.

De la même manière, des allèles *elF4E* issus de Yolo Wonder et Yolo Y, qui sont tous les deux sensibles aux TEV (Tobacco etch virus), ont été exprimés chez un génotype de piment résistant au TEV : Florida VR2. On observe que cette expression permet la multiplication du TEV (détectée par ELISA et RT-PCR) chez ce géniteur résistant.

Le cDNA *elF4E-2* de tomate obtenu à partir de la variété Mospomorist (portant l'allèle de sensibilité SEQ ID NO: 4) a également été exprimé selon le même protocole dans le génotype de piment résistant Yolo Y.

On observe également la restauration de la sensibilité au PVY des piments Yolo Y exprimant le cDNA *elF4E-2* de tomate.

Ces résultats confirment l'implication de *elF4E* dans la sensibilité à différents potyvirus, et montre en outre que ce système fonctionne en hétérologue (gène de la tomate qui fonctionne chez le piment).

Exemple 8 : Recherche de mutants dans le gène *elF4E* et dans les gènes du complexe d'initiation de la traduction des ARN pour la création de plantes résistantes aux potyvirus.

Les membres de la famille multi-génique *elF4E* appartiennent à un complexe d'au moins 8 protéines formant le complexe d'initiation de la traduction dans les cellules eucaryotes (Browning 1996).

L'identification et la caractérisation de mutants dans *elF4E* et dans les autres gènes du complexe d'initiation de la traduction pour la création de plantes résistantes aux potyvirus se déroule en 4 étapes et utilise un système de TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes, McCallum et al., 2000) :

(1) Génération d'une collection de mutants de tomate par mutagenèse chimique. Le génotype choisi est une microtomate, *Lycopersicon esculentum* Microtom qui présente des caractéristiques biologiques intéressantes (Meissner et al., 2000) : sensible aux potyvirus (PVY, TEV et PVMV), croissance à haute densité (1000 plantes/m²) et temps de génération de 3-4 mois. Les mutations sont obtenues par mutagenèse chimique à l'éthyl-méthyl sulfonate (EMS) (Koomneef et al., 1982) :

mutagenèse sur 30 000 graines, semis des mutants et fabrication de la génération M2 à partir de 5000 plantes M1.

(2) Extraction d'ADN de 20 plantes par famille M2 et constitution de pools d'ADN en 3 dimensions à partir d'une population de 100 000 plantes M2 (5000 familles).

(3) Amplification par PCR des gènes cibles et recherche des mutations par HPLC dénaturante. Les séquences des gènes impliqués dans le complexe d'initiation de la traduction sont disponibles sur le site <http://www.tigr.org/tdb/lgi>. Les produits PCR sont ensuite dénaturés puis appariés pour permettre la formation d'hétéroduplexes. Les mutations sont ensuite détectées soit par HPLC dénaturante (McCallum et al., 2000) soit par une enzyme qui permet la détection des "mismatch" dans les hétéroduplex (enzyme CEL1, Oleykowski et al., 1998).

(4) Caractérisation des mutants pour évaluation de leur comportement vis-à-vis des potyvirus : passage d'un phénotype sensible à un phénotype résistant. La procédure d'inoculation et de détection des potyvirus (Potato virus Y, Tobacco etch virus, Pepper vein mottle virus) est identique à celle décrite dans l'exemple 3.

Exemple 9 : Création de plantes résistantes aux potyvirus par des méthodes pouvant impliquer la transgénèse.

Alternativement à l'exemple 8, l'allèle de résistance du gène *elf4E* (identifié ici chez le piment) ou tout autre allèle de *elf4E* qui confère la résistance aux potyvirus (identifié à la base des exemples 1 à 8) peut être transféré *in planta* par des méthodes de type mutagenèse dirigée (Hohn et al., 1999), recombinaison homologue (Kempin et al., 1997) ou par des méthodes de surexpression. Dans les expériences de surexpression, l'allèle d'*elf4E* qui confère la résistance est exprimé sous un promoteur fort de type 35S du virus CaMV par transgénèse *in planta* (Jones et al., 1992; Bevan 1984).

Des plantes résistance peuvent également être créées par knock-out du gène *elf4E* endogène par des méthodes de type "gene silencing" (Post Transcriptional Gene Silencing) et l'expression simultanée par transgénèse de la forme de *elf4E* conférant la résistance aux potyvirus. Un knock-out spécifique par PTGS peut-être réalisé en le digérant contre le 5' UTR du gène *elf4E* endogène; la forme d'*elf4E* qui confère la résistance exprimée par transgénèse ne portera pas la séquence 5' UTR du *elf4E* endogène. Cette spécificité du knock-out par PTGS contre les 5' UTR est basée sur les nouvelles données issues de la compréhension du mécanisme de PTGS (Nishikura 2001).

Bibliographie

- Altschul et al., 1990, *J.Mol.Biol.*, 215 :403-10
- Altschul et al., 1993, *J.Mol.Evol.*, 36:290-300
- Bevan et al., 1984, *NAR* 12, 8711-8721
- 5 Bos, 1969, *Meded. Fac. Landbouwwet Gent* 34, 875-887
- Browning, 1996. *Plant Mol. Biol.* 32:107-144
- Caranta et al., 1997 *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10(7), 872-878
- Chapman et al., 1992. *Plant J.* 2(4):549-557
- Church et Gilbert 1984, *PNAS* 81, 1991-1995
- 10 Dogimont et al., 1996. *Euphytica* 88:231-239
- Dougherty et Carrington, 1988. *Annual review of Phytopathology* 26, 123-143
- Flor, 1955. *Phytopathol.* 45:680-685
- Filatti et al., 1987. *Bio/Technology* 5:726-730
- Fraser, 1992. *Euphytica* 63:175-185
- 15 Fulton et Tanksley, 1995.
- Hammond-Kosack et Jones, 1997. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:575-607
- Hohn et al., 1999, *PNAS* 96, 8321-8323
- Jakab et al., 1997, *Journal of General Virology* 78, 3141-3145
- Jones et al., 1992, *Transgenic research* 1, 285-297
- 20 Keller et al., 1998. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:124-130
- Kempin et al., 1997, *Nature* 389, 802-803
- Kohler et Milstein, 1975 *Nature* 256, 495
- Koornneef et al., 1982. *Mutat. Res.* 93:109.123
- Kozbor et al. 1983, *Hybridoma* 2 (1), 7-16
- 25 Langenberg et Zhang, 1997. *Journal of Structural Biology* 118, 243-247
- Légnani et al, 1995 *Euphytica* 86, 219-226.
- Légnani et al, 1996, *Plant disease*, 80 (3), 306-309
- McCallum et al., 2000. *Plant Physiol.* 123:439-442
- McCormick et al., 1986. *Plant Cell Reports* 5:81-84
- 30 Martin et Gelie, 1997. *European Journal of Plant Pathology* 103, 427-431
- Martineau et al., 1998, *Journal of Molecular Biology* 280 (1), 117-127
- Meissner et al., 2000. *Plant J.* 22:265-274
- Morel, 2001. Thèse de Doctorat de l'Université de Rennes 1, 136.
- Murphy et al., 1990, *Virology* 178, 285-288
- 35 Nicolas et al., 1997. *Virology* 237:452-459
- Nishikura, 2001, *Cell* 107, 415-418
- Oleykowski et al., 1998. *Nucleic Acids Res.* 26:4597-4602
- Redondo, 2001. Thèse de Doctorat de l'Université Bordeaux 2, 160pp.

- Riechmann et al., 1992. *Journal of General Virology* 73, 1-16
- Rodriguez et al., 1998. *Plant J.* 13(4):465-473.
- Rudd K et al., 1998. *J. Biol. Chem.* 273 (17) : 10325-10330
- Sambrook et al., 1989 *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*,
- 5 Sanchez-Pescador et al., 1988. *J. Clin. Microbiol.* 26 (10) : 1934-1938
- Schaad et al., 2000. *Virology* 273:300-306
- Takahashi et al., 1997 *Virus genes* 14(3), 235-243.
- Urdea et al., 1988. *Nucleic Acids Research.* 11 : 4937-4957
- Wittman et al. 1997. *Virology* 234:84-92

REVENDECATIONS

1) Procédé de sélection de plantes résistantes aux potyvirus, caractérisé en ce qu'il comprend la détection dans les plantes à tester :

- de la présence ou de l'absence d'une protéine eIF4E (dénommée ci-après : « protéine eIF4E de type sauvage ») comprenant une région définie par la séquence (I) ci-après

DX₁X₂X₃X₄KSX₅QX₆AWGSSX₇RX₈X₉YTFSX₁₀VEX₁₁FWX₁₂X₁₃YNNIHX₁₄PSKL
X₁₅X₁₆GAD

dans laquelle :

- X₁, X₂, X₃, X₄, X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀, X₁₂, X₁₃, X₁₅, et X₁₆ représentent chacun un acide aminé neutre ;
- X₅ et X₁₄ représentent un acide aminé basique ;
- X₁₁ représente un acide aminé acide ;
- D, K, S, Q, A, W, G, R, Y, T, F, V, E, N, I, H, P, et L ont leur signification usuelle en code 1-lettre, ou d'une séquence nucléotidique codant pour ladite protéine ;
- de la présence ou de l'absence d'une protéine eIF4E mutante comprenant une région dérivée de celle définie par la séquence (I), par substitution d'au moins un acide aminé neutre de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé, et/ou substitution d'au moins un acide aminé chargé de ladite séquence (I) par un acide aminé neutre ou un acide aminé de charge opposée, ou d'une séquence codant pour ladite protéine ;
- et la sélection des plantes où l'on détecte une protéine eIF4E mutante ou une séquence nucléotidique codant pour ladite protéine, et où l'on ne détecte pas de protéine eIF4E de type sauvage ou de séquence codant pour ladite protéine.

2) Procédé de sélection de plantes utilisables pour l'obtention de plantes résistantes aux potyvirus, caractérisé en ce qu'il comprend la détection dans les plantes à tester de la présence ou de l'absence d'une protéine eIF4E mutante telle que définie dans la revendication 1, ou d'une séquence codant pour ladite protéine, et la sélection des plantes où l'on détecte ladite protéine eIF4E mutante ou une séquence codant pour ladite protéine.

3) Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite protéine eIF4E mutante comprend une région dérivée de celle définie par la séquence (I), par :

- a) substitution d'au moins un des acides aminés X₁, X₂, X₃ ou X₄ de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé, et
- b) substitution d'au moins un des autres acides aminés neutres de ladite séquence (I) par un acide aminé chargé et/ou substitution d'au moins un acide aminé

chargé de ladite séquence (I) par un acide aminé neutre ou un acide aminé de charge opposée.

4) Utilisation d'un outil de sélection choisi parmi :

- 5 a) un polynucléotide codant pour une protéine eIF4E de type sauvage ou mutante, telles que définies dans une quelconque des revendications 1 ou 3 ;
b) un polynucléotide complémentaire du polynucléotide a) ;
c) un fragment d'au moins 10 pb d'un polynucléotide a) ou b) ;
pour la sélection de plantes résistantes aux potyvirus.

10 5) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que les plantes sélectionnées font partie du groupe des solanacées, du groupe des crucifères, du groupe des composées et/ou du groupe des cucurbitacées.

6) Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que les plantes sélectionnées sont des solanacées.

15 7) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que ladite protéine eIF4E est choisie parmi :

- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 3 ;
- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 5 ;
- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 7 ;
- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 9 ;
- 20 - le groupe de protéines représenté par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 22 ;
- le groupe de protéines représenté par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 23 ;

25 8) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit polynucléotide est choisi parmi :

- le polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 2 ;
- le polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 4 ;
- le polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 6 ;
- le polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 8 ;

30 ainsi que leurs complémentaires, ou les fragments d'au moins 10 pb desdits polynucléotides ou complémentaires.

9) Procédé de sélection de plantes résistantes aux potyvirus, caractérisé en ce que :

- on digère l'ADN extrait d'une plante à tester par une enzyme de restriction appropriée ;
- on dénature l'ADN digéré ;
- on met ledit ADN dénaturé en présence d'une sonde constituée par un polynucléotide tel que défini dans une quelconque des revendications 4 à 8,

préalablement pourvu d'au moins un marqueur, de façon à réaliser l'hybridation entre ledit polynucléotide et ledit ADN ;

- on élimine l'ADN et la sonde non hybridés ;
- on révèle l'hybridation à l'aide du marqueur ;
- 5 - on sélectionne les plantes qui possèdent un profil d'hybridation correspondant à la co-ségrégation de la cible hybridée avec la sonde marquée et de l'allèle de résistance ou de sensibilité, la distinction entre les plantes sensibles et les plantes résistantes se faisant par la différence de taille des fragments hybridés.

10 10) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'enzyme de restriction utilisée est *EcoRI*.

11) Procédé de sélection de plantes résistantes aux potyvirus, caractérisé en ce que :

- on amplifie par PCR la séquence codante du gène *eIF4E*, à partir de l'ADN de la plante à tester ;
- 15 - on digère le produit d'amplification avec une enzyme de restriction appropriée ;
- on sépare les éventuels fragments obtenus ;
- et on sélectionne les plantes résistantes ou sensibles selon le profil de restriction dudit produit d'amplification.

12) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que les plantes sensibles aux potyvirus sont détectées par un profil de restriction faisant apparaître la présence d'un site de coupure par l'enzyme *TspRI* ou l'un de ses isoschizomères et les plantes résistantes aux potyvirus sont détectées par un profil de restriction faisant apparaître l'absence dudit site de coupure par *TspRI* ou l'un de ses isoschizomères et la présence d'un site de coupure par l'enzyme *MniI* ou l'un de ses isoschizomères.

25 13) Procédé selon une quelconque des revendications 11 ou 12, caractérisé en ce que l'amplification par PCR de la séquence codante du gène *eIF4E*, est effectuée en utilisant comme amorces les oligonucléotides SEQ ID NO:18 et SEQ ID NO:19.

14) Polynucléotide codant pour une protéine eIF4E mutante telle que définie dans une quelconque des revendications 1 ou 3.

15) Polynucléotide selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il est représenté par la séquence SEQ ID NO: 8

16) Polynucléotide utilisable comme amorce pour l'amplification par PCR d'une séquence codant pour une protéine eIF4E de plante, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe défini par les séquences suivantes :

- SEQ ID NO: 18
- SEQ ID NO: 19.

17) Kit pour la mise en œuvre d'un procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins une enzyme de restriction choisie parmi :

- 5 a) une enzyme reconnaissant un site de restriction I présent dans au moins un allèle de *eIF4E* associé à la sensibilité aux potyvirus, et absent des allèles de *eIF4E* associés à la résistance aux potyvirus ;
- b) une enzyme reconnaissant un site de restriction II présent dans au moins un allèle de *eIF4E* associé à la résistance aux potyvirus, et absent des allèles de *eIF4E* associés à la sensibilité aux potyvirus ; et
- 10 - une paire d'amorces nucléotidiques permettant d'amplifier *eIF4E* ou une portion de celui-ci comprenant le site de restriction I et/ou le site de restriction II.

18) Kit selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une paire d'amorces définies par les séquences SEQ ID NO: 18 et SEQ ID NO: 19 ;
- 15 - au moins une enzyme de restriction choisie parmi *TspRI* ou l'un de ses isoschizomères et *MvnI* ou l'un de ses isoschizomères.

19) Utilisation d'un site de restriction par *MvnI* correspondant de préférence à la séquence sens : CG[^]CG et à la séquence antisens : GC[^]GC, et/ou d'un site de restriction par *TspRI* correspondant de préférence à la séquence sens: NNCASTGNN[^] et à la séquence antisens : [^]NNGTSACNN, comme marqueur(s) oligonucléotidique(s) de

20 résistance ou de sensibilité aux potyvirus.

20) Utilisation d'une protéine eIF4E de type sauvage ou mutante, telles que définies dans une quelconque des revendications 1 ou 3, ou d'un anticorps spécifique d'une desdites protéines, pour la sélection de plantes résistantes aux potyvirus.

25 21) Utilisation selon la revendication 20, caractérisée en ce que ladite protéine eIF4E est choisie parmi :

- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 3 ;
- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 5 ;
- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 7 ;
- 30 - la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 9 ;
- le groupe de protéines représenté par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 22 ;
- le groupe de protéines représenté par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 23 ;

35 22) Protéine eIF4E mutante telle que définie dans une quelconque des revendications 1 ou 3.

23) Protéine eIF4E mutante selon la revendication 22 choisie parmi :

- la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 9 ;

- les variants de la protéine représentée par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 22 ;
- le groupe de la protéine représentée d par la séquence polypeptidique SEQ ID NO: 23 ;

5 24) Anticorps spécifiquement dirigés contre une protéine eIF4E mutante selon une quelconque des revendications 1 ou 3, ou un fragment d'au moins 6 acides aminés dudit polypeptide.

 25) Procédé non biologique d'obtention de plantes résistantes à au moins un potyvirus caractérisé en ce qu'il comprend l'introduction d'un allèle du gène *eIF4E*
10 associé à la résistance audit potyvirus dans le génome desdites plantes.

 26) Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que l'apparition de l'allèle de résistance est provoquée par la mise en oeuvre d'une méthode sélectionnée dans le groupe comprenant :

- mutagenèse, avantageusement "Tilling",
- 15 - recombinaison homologue,
- surexpression,
- insertion/délétion,
- "gene silencing" / transgénèse,
- et leurs combinaisons.

20 27) Unité génétique construite, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polynucléotide tel que défini dans une quelconque des revendications 4 à 6, 8.

 28) Vecteur de transformation de cellules végétales, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une unité génétique selon la revendication 27.

25 29) Cellules végétales transformées au moyen d'au moins un vecteur selon la revendication 28 ou d'au moins une unité génétique selon la revendication 27.

 30) Microorganismes transformés au moyen d'au moins un vecteur selon la revendication 28 ou d'au moins une unité génétique selon la revendication 27.

 31) Plantes transformées au moyen d'au moins un vecteur selon la revendication 28 ou d'au moins une unité génétique selon la revendication 27.

1/3

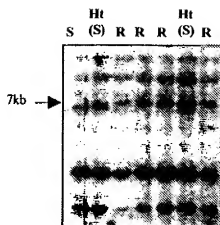


FIG.1



FIG.2

2/3

YW MATAEMKTTTTFDEAEKVKLNANEADDEVEEGEIVEETDDTTSYLSKEIATKHPLEHSWT
 DDL MATAEMKTTTTFDEAEKVKLNANEADDEVEEGEIVEETDDTTSYLSKEIATKHPLEHSWT
 FM1008 MATAEMKTTTTFDEAEKVKLNANEADDEVEEGEIVEETDDTTSYLSKEIATKHPLEHSWT
 YY MATAEMKTTTTFDEAEKVKLNANEADDEVEEGEIVEETDDTTSYLSKEIATKHPLEHSWT
 Avelar MATAEMKTTTTFDEAEKVKLNANEADDEVEEGEIVEETDDTTSYLSKEIATKHPLEHSWT
 Vania MATAEMKTTTTFDEAEKVKLNANEADDEVEEGEIVEETDDTTSYLSKEIATKHPLEHSWT
 PM994 MATAEMKTTTTFDEAEKVKLNANEADDEVEEGEIVEETDDTTSYLSKEIATKHPLEHSWT
 Florida MATAEMKTTTTFDEAEKVKLNANEADDEVEEGEIVEETDDTTSYLSKEIATKHPLEHSWT
 C69 MATAEMKTTTTFDEAEKVKLNANEADDEVEEGEIVEETDDTTSYLSKEIATKHPLEHSWT
 CM334 MATAEMKTTTTFDEAEKVKLNANEADDEVEEGEIVEETDDTTSYLSKEIATKHPLEHSWT
 FM1014 MATAEMKTTTTFDEAEKVKLNANEADDEVEEGEIVEETDDTTSYLSKEIATKHPLEHSWT
 Per MATAEMKTTTTFDEAEKVKLNANEADDEVEEGEIVEETDDTTSYLSKEIATKHPLEHSWT

YW FWFDPNPAKSKQAANGSSLRNVYTFSTVEDFWGAYNNIIHPSKLVVGADLHCFKHKIEPK
 DDL FWFDPNPAKSKQAANGSSLRNVYTFSTVEDFWGAYNNIIHPSKLVVGADLHCFKHKIEPK
 FM1008 FWFDPNPAKSKQAANGSSLRNVYTFSTVEDFWGAYNNIIHPSKLVVGADLHCFKHKIEPK
 YY FWFDPNPAKSKQAANGSSLRNVYTFSTVEDFWGAYNNIIHPSKLVVGADLHCFKHKIEPK
 Avelar FWFDPNPAKSKQAANGSSLRNVYTFSTVEDFWGAYNNIIHPSKLVVGADLHCFKHKIEPK
 Vania FWFDPNPAKSKQAANGSSLRNVYTFSTVEDFWGAYNNIIHPSKLVVGADLHCFKHKIEPK
 PM994 FWFDPNPAKSKQAANGSSLRNVYTFSTVEDFWGAYNNIIHPSKLVVGADLHCFKHKIEPK
 Florida FWFDPNPAKSKQAANGSSLRNVYTFSTVEDFWGAYNNIIHPSKLVVGADLHCFKHKIEPK
 C69 FWFDPNPAKSKQAANGSSLRNVYTFSTVEDFWGAYNNIIHPSKLVVGADLHCFKHKIEPK
 CM334 FWFDPNPAKSKQAANGSSLRNVYTFSTVEDFWGAYNNIIHPSKLVVGADLHCFKHKIEPK
 FM1014 FWFDPNPAKSKQAANGSSLRNVYTFSTVEDFWGAYNNIIHPSKLVVGADLHCFKHKIEPK
 Per FWFDPNPAKSKQAANGSSLRNVYTFSTVEDFWGAYNNIIHPSKLVVGADLHCFKHKIEPK

YW WEDPVCANGGTWKMSFSKGKSDTSWLYTLLAMIGHQFDHEDEICGAVSVRGKGKISLW
 DDL WEDPVCANGGTWKMSFSKGKSDTSWLYTLLAMIGHQFDHEDEICGAVSVRGKGKISLW
 FM1008 WEDPVCANGGTWKMSFSKGKSDTSWLYTLLAMIGHQFDHEDEICGAVSVRGKGKISLW
 YY WEDPVCANGGTWKMSFSKGKSDTSWLYTLLAMIGHQFDHEDEICGAVSVRGKGKISLW
 Avelar WEDPVCANGGTWKMSFSKGKSDTSWLYTLLAMIGHQFDHEDEICGAVSVRGKGKISLW
 Vania WEDPVCANGGTWKMSFSKGKSDTSWLYTLLAMIGHQFDHEDEICGAVSVRGKGKISLW
 PM994 WEDPVCANGGTWKMSFSKGKSDTSWLYTLLAMIGHQFDHEDEICGAVSVRGKGKISLW
 Florida WEDPVCANGGTWKMSFSKGKSDTSWLYTLLAMIGHQFDHEDEICGAVSVRGKGKISLW
 C69 WEDPVCANGGTWKMSFSKGKSDTSWLYTLLAMIGHQFDHEDEICGAVSVRGKGKISLW
 CM334 WEDPVCANGGTWKMSFSKGKSDTSWLYTLLAMIGHQFDHEDEICGAVSVRGKGKISLW
 FM1014 WEDPVCANGGTWKMSFSKGKSDTSWLYTLLAMIGHQFDHEDEICGAVSVRGKGKISLW
 Per WEDPVCANGGTWKMSFSKGKSDTSWLYTLLAMIGHQFDHEDEICGAVSVRGKGKISLW

YW TKNAANETAQVSIQKQWKQFLDYSDSVGFI FHDDAKRLDRNARNRYTV
 DDL TKNAANETAQVSIQKQWKQFLDYSDSVGFI FHDDAKRLDRNARNRYTV
 FM1008 TKNAANETAQVSIQKQWKQFLDYSDSVGFI FHDDAKRLDRNARNRYTV
 YY TKNAANETAQVSIQKQWKQFLDYSDSVGFI FHDDAKRLDRNARNRYTV
 Avelar TKNAANETAQVSIQKQWKQFLDYSDSVGFI FHDDAKRLDRNARNRYTV
 Vania TKNAANETAQVSIQKQWKQFLDYSDSVGFI FHDDAKRLDRNARNRYTV
 PM994 TKNAANETAQVSIQKQWKQFLDYSDSVGFI FHDDAKRLDRNARNRYTV
 Florida TKNAANETAQVSIQKQWKQFLDYSDSVGFI FHDDAKRLDRNARNRYTV
 C69 TKNAANETAQVSIQKQWKQFLDYSDSVGFI FHDDAKRLDRNARNRYTV
 CM334 TKNAANETAQVSIQKQWKQFLDYSDSVGFI FHDDAKRLDRNARNRYTV
 FM1014 TKNAANETAQVSIQKQWKQFLDYSDSVGFI FHDDAKRLDRNARNRYTV
 Per TKNAANETAQVSIQKQWKQFLDYSDSVGFI FHDDAKRLDRNARNRYTV

Fig 3

3/3




Mospo	MAAAEMERTMSFDAAEKKAADGGGGEVDDLEEGEIVEESNDTASYLGKEITVKHPLEH
PI13	MAAAEMERTMSFDAAEKKAADGGGGEVDDLEEGEIVEESNDTASYLGKEITVKHPLEH
PI24	MAAAEMERTMSFDAAEKKAADGGGGEVDDLEEGEIVEESNDTASY <u>FG</u> KEITVKHPLEH
Mospo	SWTFWFDNPTTKSRQTAWGSSLRNVYTFSTVEDFWGAYNNIHHPSKLI  GADFHCFKHKI
PI13	SWTFWFDNSTTKSRQTAWGSSLRNLVYTFSTVEDFWGAYNNIHHPSKLI  GADFHCFKHKI
PI24	SWTFWFDKSTTKSRQT <u>DW</u> GSSLRNLVYTFSTVEDFWGAYNNIHHPSKLI  GADFHCFKHKI
Mospo	EPQWEDPVCANGGTWKMSFSKGKSDTSWLYTLLAMIGHQFDHGDEICGAVVSVRAKGEKI
PI13	EPQWEDPVCANGGTWKMSFSKGKSDTSWLYTLLAMIGHQFDHGDEICGAVVSVRAKGEKI
PI24	EPQWEDPVCANGGTWKMSFSKGKSDTSWLYTLLAMIGHQFDHGDEICGAVVSVRAKGEKI
Mospo	ALWTKNAANETAQVSIGKQWKQFLDYSDSVGFI FHDDAKRLDRNALNRYTV
PI13	ALWTKNAANETAQVSIGKQWKQFLDYSDSVGFI FHDDAKRLDRSALNRYTV
PI24	ALWTKNAANETAQVSIGKQWKQFLDYSDSVGFI FHDDAKRLDRSALNRYTV

Fig 3

SEQUENCE LISTING

<110> GENOPLANTE-VALOR
CARANTA, Carole
RUFFEL, Sandrine
BENDAHMANE, Abdelhafid
PALLOIX, Alain
ROBAGLIA, Christophe

<120> Mutations du gène eIF4E et résistance aux potyvirus

<130> MJPbv1516-9

<150> FR 02 13678
<151> 2002-10-31

<150> FR 02 01583
<151> 2002-02-08

<160> 23

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 46
<212> PRT
<213> Consensus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(5)
<223> Xaa = A, V, L, I, P, W, F, M, G, S, T, Y, C, Q ou N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = H, K ou L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Xaa = A, V, L, I, P, W, F, M, G, S, T, Y, C, Q ou N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> Xaa = A, V, L, I, P, W, F, M, G, S, T, Y, C, Q ou N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(19)
<223> Xaa = A, V, L, I, P, W, F, M, G, S, T, Y, C, Q ou N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> Xaa = A, V, L, I, P, W, F, M, G, S, T, Y, C, Q ou N

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)
 <223> Xaa = D ou E

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (30)..(31)
 <223> Xaa = A, V, L, I, P, W, F, M, G, S, T, Y, C, Q ou N

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (37)..(37)
 <223> Xaa = K, L ou H

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (42)..(43)
 <223> Xaa = A, V, L, I, P, W, F, M, G, S, T, Y, C, Q ou N

<400> 1
 Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Ser Xaa Gln Xaa Ala Trp Gly Ser Ser Xaa
 1 5 10 15
 Arg Xaa Xaa Tyr Thr Phe Ser Xaa Val Glu Xaa Phe Trp Xaa Xaa Tyr
 20 25 30
 Asn Asn Ile His Xaa Pro Ser Lys Leu Xaa Xaa Gly Ala Asp
 35 40 45

<210> 2
 <211> 961
 <212> DNA
 <213> Nicotiana sp.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(961)
 <223> cDNA du gène eIF4E

<220>
 <221> CDS
 <222> (148)..(816)
 <223>

<400> 2
 gaattcggca cgaggaaaca ttgaactttt cctacgaata caaattcggga atttctgtga 60
 gaagttacac atttttcagtt gaaacccatc accaaaagtc caaaatcaca aatttccaga 120
 cgaagcttat gtgttgagaa caccaaaa atg gtt gat gaa gta gag aaa ccg gtg 174
 Met Val Asp Glu Val Glu Lys Pro Val
 1 5
 tcg tta gag gaa tcg aag act aat act cgt gag gtg gaa gag gaa gga 222
 Ser Leu Glu Glu Ser Lys Thr Asn Thr Arg Glu Val Glu Glu Glu Gly
 10 15 20 25
 gag atc gtg ggg gaa tca gac gat acg atg tcg tct tta ggg aac cca 270
 Glu Ile Val Gly Glu Ser Asp Asp Thr Met Ser Ser Leu Gly Asn Pro
 30 35 40

agc atg gca atg aaa cac gcg cta gaa cat tca tgg aca ttt tgg ttc Ser Met Ala Met Lys His Ala Leu Glu His Ser Trp Thr Phe Trp Phe 45 50 55	318
gat aac cca tca ggg aaa tca aaa cag gct gct tgg ggt agt tcc att Asp Asn Pro Ser Gly Lys Ser Lys Gln Ala Ala Trp Gly Ser Ser Ile 60 65 70	366
cga cca att tac acc ttc tcc act gtc gaa gat ttt tgg agt gtg tac Arg Pro Ile Tyr Thr Phe Ser Thr Val Glu Asp Phe Trp Ser Val Tyr 75 80 85	414
aac aat atc cac cac cca agc aaa ttg gct gtg ggg gca gac ttt cac Asn Asn Ile His His Pro Ser Lys Leu Ala Val Gly Ala Asp Phe His 90 95 100 105	462
tgt ttt aag aat aaa att gag cca aag tgg gag gat cct gtc tgc gcc Cys Phe Lys Asn Lys Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Val Cys Ala 110 115 120	510
aac gga gga aag tgg aca atg agc ttt tcg agg ggt aaa tct gat acc Asn Gly Gly Lys Trp Thr Met Ser Phe Ser Arg Gly Lys Ser Asp Thr 125 130 135	558
tgc tgg ctg tat acg ctg ctg gct atg att gga gaa caa ttt gac tgc Cys Trp Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Met Ile Gly Glu Gln Phe Asp Cys 140 145 150	606
gga gat gaa att tgt gga gct gtt att aat gtt cga gtt aga caa gaa Gly Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Ile Asn Val Arg Val Arg Gln Glu 155 160 165	654
aaa ata gct ttg tgg acc agg aat gct gcc aat gaa aca gct cag gtg Lys Ile Ala Leu Trp Thr Arg Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala Gln Val 170 175 180 185	702
agc att ggt aaa cag tgg aag gaa ttt ctg gat tac aat gac tcg gtt Ser Ile Gly Lys Gln Trp Lys Glu Phe Leu Asp Tyr Asn Asp Ser Val 190 195 200	750
ggc ttt ata ttt cat gat gat gca aag aag cta gac aga gct gcc aag Gly Phe Ile Phe His Asp Asp Ala Lys Lys Leu Asp Arg Ala Ala Lys 205 210 215	798
aat cgt tat tct gtg tag ttctatcggt acaataggaa ttgtgaacga Asn Arg Tyr Ser Val 220	846
cacagtgtact gagaagcagtt caccctgtggc tgccgtgttt gaccgcttac attggtattc	906
acagttttca taaggaaatt tgtttggttt tgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa	961

<210> 3
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Nicotiana sp.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(961)

<223> cDNA du gène eIF4E

<400> 3

Met Val Asp Glu Val Glu Lys Pro Val Ser Leu Glu Glu Ser Lys Thr
 1 5 10 15

Asn Thr Arg Glu Val Glu Glu Glu Gly Glu Ile Val Gly Glu Ser Asp
 20 25 30

Asp Thr Met Ser Ser Leu Gly Asn Pro Ser Met Ala Met Lys His Ala
 35 40 45

Leu Glu His Ser Trp Thr Phe Trp Phe Asp Asn Pro Ser Gly Lys Ser
 50 55 60

Lys Gln Ala Ala Trp Gly Ser Ser Ile Arg Pro Ile Tyr Thr Phe Ser
 65 70 75 80

Thr Val Glu Asp Phe Trp Ser Val Tyr Asn Asn Ile His His Pro Ser
 85 90 95

Lys Leu Ala Val Gly Ala Asp Phe His Cys Phe Lys Asn Lys Ile Glu
 100 105 110

Pro Lys Trp Glu Asp Pro Val Cys Ala Asn Gly Gly Lys Trp Thr Met
 115 120 125

Ser Phe Ser Arg Gly Lys Ser Asp Thr Cys Trp Leu Tyr Thr Leu Leu
 130 135 140

Ala Met Ile Gly Glu Gln Phe Asp Cys Gly Asp Glu Ile Cys Gly Ala
 145 150 155 160

Val Ile Asn Val Arg Val Arg Gln Glu Lys Ile Ala Leu Trp Thr Arg
 165 170 175

Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala Gln Val Ser Ile Gly Lys Gln Trp Lys
 180 185 190

Glu Phe Leu Asp Tyr Asn Asp Ser Val Gly Phe Ile Phe His Asp Asp
 195 200 205

Ala Lys Lys Leu Asp Arg Ala Ala Lys Asn Arg Tyr Ser Val
 210 215 220

<210> 4

<211> 696

<212> DNA

<213> Lycopersicon esculentum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(696)

<223> eIF4E var. Mospomorist

<400> 4

atg gca gca gct gaa atg gag aga acg atg tcg ttt gat gca gct gag
 Met Ala Ala Ala Glu Met Glu Arg Thr Met Ser Phe Asp Ala Ala Glu
 1 5 10 15

48

aag ttg aag gcc gcc gat gga gga gga gga gag gta gac gat gaa ctt Lys Leu Lys Ala Ala Asp Gly Gly Gly Gly Glu Val Asp Asp Glu Leu 20 25 30	96
gaa gaa ggt gaa att gtt gaa gaa tca aat gat acg gca tgg tat tta Glu Glu Gly Glu Ile Val Glu Glu Ser Asn Asp Thr Ala Ser Tyr Leu 35 40 45	144
ggg aaa gaa atc aca gtg aag cat cca ttg gag cat tca tgg act ttt Gly Lys Glu Ile Thr Val Lys His Pro Leu Glu His Ser Trp Thr Phe 50 55 60	192
tgg ttt gat aac cct acc act aaa tct cga caa act gct tgg gga agc Trp Phe Asp Asn Pro Thr Thr Lys Ser Arg Gln Thr Ala Trp Gly Ser 65 70 75 80	240
tca ctt cga aat gtc tac act ttc tcc act gtt gaa gat ttt tgg ggt Ser Leu Arg Asn Val Tyr Thr Phe Ser Thr Val Glu Asp Phe Trp Gly 85 90 95	288
gct tac aat aat atc cat cac cca agc aag tta att atg gga gca gac Ala Tyr Asn Asn Ile His His Pro Ser Lys Leu Ile Met Gly Ala Asp 100 105 110	336
ttt cat tgt ttt aag cac aaa att gag cca aag tgg gaa gat cct gta Phe His Cys Phe Lys His Lys Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Val 115 120 125	384
tgt gcc aat gga ggg acg tgg aaa atg agt ttt tgg aag ggt aaa tot Cys Ala Asn Gly Gly Thr Trp Lys Met Ser Phe Ser Lys Gly Lys Ser 130 135 140	432
gat acc agc cgg ctg tat acg ctg ctg gca atg att gga cat caa ttc Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Met Ile Gly His Gln Phe 145 150 155 160	480
gat cat gga gat gaa att tgt gga gca gtt gtt agt gtc cgg gct aag Asp His Gly Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Val Ser Val Arg Ala Lys 165 170 175	528
gga gaa aaa ata gct ttg tgg acc aag aat gct gca aat gaa aca gct Gly Glu Lys Ile Ala Leu Trp Thr Lys Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala 180 185 190	576
cag gtt agc att ggt aag caa tgg aag cag ttt cta gat tac agt gat Gln Val Ser Ile Gly Lys Gln Trp Lys Gln Phe Leu Asp Tyr Ser Asp 195 200 205	624
tcg gtt gcc ttc ata ttt cac gac gat gca aag agg ctc gac aga aat Ser Val Gly Phe Ile Phe His Asp Asp Ala Lys Arg Leu Asp Arg Asn 210 215 220	672
gcc ttg aat cgt tac acc gta tag Ala Leu Asn Arg Tyr Thr Val 225 230	696

<210> 5

<211> 231

<212> PRT

<213> Lycopersicon esculentum

<400> 5
Met Ala Ala Ala Glu Met Glu Arg Thr Met Ser Phe Asp Ala Ala Glu
1 5 10 15
Lys Leu Lys Ala Ala Asp Gly Gly Gly Gly Glu Val Asp Asp Glu Leu
20 25 30
Glu Glu Gly Glu Ile Val Glu Glu Ser Asn Asp Thr Ala Ser Tyr Leu
35 40 45
Gly Lys Glu Ile Thr Val Lys His Pro Leu Glu His Ser Trp Thr Phe
50 55 60
Trp Phe Asp Asn Pro Thr Thr Lys Ser Arg Gln Thr Ala Trp Gly Ser
65 70 75 80
Ser Leu Arg Asn Val Tyr Thr Phe Ser Thr Val Glu Asp Phe Trp Gly
85 90 95
Ala Tyr Asn Asn Ile His His Pro Ser Lys Leu Ile Met Gly Ala Asp
100 105 110
Phe His Cys Phe Lys His Lys Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Val
115 120 125
Cys Ala Asn Gly Gly Thr Trp Lys Met Ser Phe Ser Lys Gly Lys Ser
130 135 140
Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Met Ile Gly His Gln Phe
145 150 155 160
Asp His Gly Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Val Ser Val Arg Ala Lys
165 170 175
Gly Glu Lys Ile Ala Leu Trp Thr Lys Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala
180 185 190
Gln Val Ser Ile Gly Lys Gln Trp Lys Gln Phe Leu Asp Tyr Ser Asp
195 200 205
Ser Val Gly Phe Ile Phe His Asp Asp Ala Lys Arg Leu Asp Arg Asn
210 215 220
Ala Leu Asn Arg Tyr Thr Val
225 230

<210> 6
<211> 811
<212> DNA
<213> Capsicum annuum
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(811)
<223> séquence codante eIF4E et 3'UTR
Génotype Yolo Wonder porteur de l'allèle dominant de sensibilité
pvr2+
<220>

<221> misc feature
 <222> (195)..(204)
 <223> Site de restriction TspRI

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(687)
 <223>

<220>
 <221> 3'UTR
 <222> (688)..(811)
 <223>

<400> 6
 atg gca aca gct gaa atg gag aaa acg acg acg ttt gat gaa gct gag 48
 Met Ala Thr Ala Glu Met Glu Lys Thr Thr Phe Asp Glu Ala Glu
 1 5 10 15
 aag gtg aaa ttg aat gct aat gag gca gat gat gaa gtt gaa gaa ggt 96
 Lys Val Lys Leu Asn Ala Asn Glu Ala Asp Asp Glu Val Glu Glu Gly
 20 25 30
 gaa att gtt gaa gaa act gat gat acg acg tcg tat ttg agc aaa gaa 144
 Glu Ile Val Glu Glu Thr Asp Asp Thr Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Glu
 35 40 45
 ata gca aca aag cat cca tta gag cat tca tgg act ttc tgg ttt gat 192
 Ile Ala Thr Lys His Pro Leu Glu His Ser Trp Thr Phe Trp Phe Asp
 50 55 60
 aat cca gtg gcg aaa tcg aaa caa gct gct tgg ggt agc tcg ctt cgc 240
 Asn Pro Val Ala Lys Ser Lys Gln Ala Ala Trp Gly Ser Ser Leu Arg
 65 70 75 80
 aac gtc tac act ttc tcc act gtt gaa gat ttt tgg ggt gct tac aat 288
 Asn Val Tyr Thr Phe Ser Thr Val Glu Asp Phe Trp Gly Ala Tyr Asn
 85 90 95
 aat atc cac cac cca agc aag tta gtt gtg gga gca gac tta cat tgt 336
 Asn Ile His His Pro Ser Lys Leu Val Val Gly Ala Asp Leu His Cys
 100 105 110
 ttc aag cat aaa att gag cca aag tgg gaa gat cct gta tgt gcc aat 384
 Phe Lys His Lys Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Val Cys Ala Asn
 115 120 125
 gga ggg aca tgg aaa atg agt ttt tca aag ggt aaa tct gat acc agc 432
 Gly Gly Thr Trp Lys Met Ser Phe Ser Lys Gly Lys Ser Asp Thr Ser
 130 135 140
 tgg cta tat acg ctg ctt gca atg att gga cat caa ttc gat cat gaa 480
 Trp Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Met Ile Gly His Gln Phe Asp His Glu
 145 150 155 160
 gat gaa att tgt gga gca gta gtt agt gtc aga ggt aag gga gaa aaa 528
 Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Val Ser Val Arg Gly Lys Gly Glu Lys
 165 170 175
 ata tct ttg tgg acc aag aat gct gca aat gaa acg gct cag gtt agc 576
 Ile Ser Leu Trp Thr Lys Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala Gln Val Ser

180	185	190	
att ggt aag caa tgg aag cag ttt ctg gat tac agc gac agt gtt ggc			624
Ile Gly Lys Gln Trp Lys Gln Phe Leu Asp Tyr Ser Asp Ser Val Gly			
195	200	205	
ttc ata ttt cac gac gat gca aag agg ctc gac aga aat gca aag aat			672
Phe Ile Phe His Asp Asp Ala Lys Arg Leu Asp Arg Asn Ala Lys Asn			
210	215	220	
cgt tac aca gta taa ttcttgatgc aatgtcggaa tataaagaac acaattcgta			727
Arg Tyr Thr Val			
225			
ctgaaaaatt gaatcactag tgaattcgcg gccgcctgca ggtcgaccat atgggagagc			787
tcccaacgcg ttggatgcat agct			811
<210> 7			
<211> 228			
<212> PRT			
<213> Capsicum annum			
<220>			
<221> misc_feature			
<222> (1)..(811)			
<223> séquence codante eIF4E et 3'UTR			
Génotype Yolo Wonder porteur de l'allèle dominant de sensibilité			
pvr2+			
<220>			
<221> misc_feature			
<222> (195)..(204)			
<223> Site de restriction TspRI			
<400> 7			
Met Ala Thr Ala Glu Met Glu Lys Thr Thr Thr Phe Asp Glu Ala Glu			
1	5	10	15
Lys Val Lys Leu Asn Ala Asn Glu Ala Asp Asp Glu Val Glu Glu Gly			
20	25	30	
Glu Ile Val Glu Glu Thr Asp Asp Thr Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Glu			
35	40	45	
Ile Ala Thr Lys His Pro Leu Glu His Ser Trp Thr Phe Trp Phe Asp			
50	55	60	
Asn Pro Val Ala Lys Ser Lys Gln Ala Ala Trp Gly Ser Ser Leu Arg			
65	70	75	80
Asn Val Tyr Thr Phe Ser Thr Val Glu Asp Phe Trp Gly Ala Tyr Asn			
85	90	95	
Asn Ile His His Pro Ser Lys Leu Val Val Gly Ala Asp Leu His Cys			
100	105	110	
Phe Lys His Lys Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Val Cys Ala Asn			
115	120	125	

9/16

Gly Gly Thr Trp Lys Met Ser Phe Ser Lys Gly Lys Ser Asp Thr Ser
 130 135 140

Trp Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Met Ile Gly His Gln Phe Asp His Glu
 145 150 155 160

Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Val Ser Val Arg Gly Lys Gly Glu Lys
 165 170 175

Ile Ser Leu Trp Thr Lys Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala Gln Val Ser
 180 185 190

Ile Gly Lys Gln Trp Lys Gln Phe Leu Asp Tyr Ser Asp Ser Val Gly
 195 200 205

Phe Ile Phe His Asp Asp Ala Lys Arg Leu Asp Arg Asn Ala Lys Asn
 210 215 220

Arg Tyr Thr Val
 225

<210> 8
 <211> 811
 <212> DNA
 <213> Capsicum annuum

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(811)
 <223> séquence codante eIF4E et 3'UTR
 Génotype Yolo Y porteur de l'allèle de résistance pvr21

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(687)
 <223>

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (233)..(236)
 <223> Site de restriction MvnI

<220>
 <221> 3'UTR
 <222> (688)..(811)
 <223>

<400> 8
 atg gca aca gct gaa atg gag aaa acg acg acg ttt gat gaa gct gag 48
 Met Ala Thr Ala Glu Met Glu Lys Thr Thr Phe Asp Glu Ala Glu
 1 5 10 15

aag gtg aaa ttg aat gct aat gag gca gat gat gaa gtt gaa ggt 96
 Lys Val Lys Leu Asn Ala Asn Glu Ala Asp Asp Glu Val Glu Glu Gly
 20 25 30

gaa att gtt gaa gaa act gat gat acg acg tcg tat ttg agc aaa gaa 144
 Glu Ile Val Glu Glu Thr Asp Asp Thr Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Glu
 35 40 45

ata gca aca aag cat cca tta gag cat tca tgg act ttc tgg ttt gat ile ala thr lys his pro leu glu his ser trp thr phe trp phe asp 50 55 60	192
aat cca gag gcg aaa tcg aaa caa gct gct tgg ggt agc tcg cgt cgc asn pro glu ala lys ser lys gln ala ala trp gly ser ser arg arg 65 70 75 80	240
aac gtc tac act ttc tcc act gtt gaa gat ttt tgg ggt gct tac aat asn val tyr thr phe ser thr val glu asp phe trp gly ala tyr asn 85 90 95	288
aat atc cac cac cca agc aag tta gtt gtg gga gca gac tta cat tgt asn ile his his pro ser lys leu val val gly ala asp leu his cys 100 105 110	336
ttc aag cat aaa att gag cca aag tgg gaa gat cct gta tgt gcc aat phe lys his lys ile glu pro lys trp glu asp pro val cys ala asn 115 120 125	384
gga ggg aca tgg aaa atg agt ttt tca aag ggt aaa tct gat acc agc gly gly thr trp lys met ser phe ser lys gly lys ser asp thr ser 130 135 140	432
tgg cta tat acg ctg ctt gca atg att gga cat caa ttc gat cat gaa trp leu tyr thr leu leu ala met ile gly his gln phe asp his glu 145 150 155 160	480
gat gaa att tgt gga gca gta gtt agt gtc aga ggt aag gga gaa aaa asp glu ile cys gly ala val val ser val arg gly lys gly glu lys 165 170 175	528
ata tct ttg tgg acc aag aat gct gca aat gaa acg gct cag gtt agc ile ser leu trp thr lys asn ala ala asn glu thr ala gln val ser 180 185 190	576
att ggt aag caa tgg aag cag ttt ctg gat tac agc gac agt gtt ggc ile gly lys gln trp lys gln phe leu asp tyr ser asp ser val gly 195 200 205	624
ttc ata ttt cac gac gat gca aag agg ctc gac aga aat gca aag aat phe ile phe his asp ala lys arg leu asp arg asn ala lys asn 210 215 220	672
cgt tac aca gta taa ttcttgatgc aatgtcggaa tataagaac acaattcgta arg tyr thr val 225	727
ctgaaaggt gaactactag tgaattcgcg gccgcctgca ggtcgaccat atgggagagc	787
tccaacgcg ttgatgcatt agct	811

<210> 9

<211> 228

<212> PRT

<213> Capsicum annuum

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(811)

<223> séquence codante eIF4E et 3'UTR
Génotype Yolo Y porteur de l'allèle de résistance pvr21

<220>

<221> misc feature

<222> (233)..(236)

<223> Site de restriction MvnI

<400> 9

Met Ala Thr Ala Glu Met Glu Lys Thr Thr Thr Phe Asp Glu Ala Glu
1 5 10 15

Lys Val Lys Leu Asn Ala Asn Glu Ala Asp Asp Glu Val Glu Glu Gly
20 25 30

Glu Ile Val Glu Glu Thr Asp Asp Thr Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Glu
35 40 45

Ile Ala Thr Lys His Pro Leu Glu His Ser Trp Thr Phe Trp Phe Asp
50 55 60

Asn Pro Glu Ala Lys Ser Lys Gln Ala Ala Trp Gly Ser Ser Arg Arg
65 70 75 80

Asn Val Tyr Thr Phe Ser Thr Val Glu Asp Phe Trp Gly Ala Tyr Asn
85 90 95

Asn Ile His His Pro Ser Lys Leu Val Val Gly Ala Asp Leu His Cys
100 105 110

Phe Lys His Lys Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Val Cys Ala Asn
115 120 125

Gly Gly Thr Trp Lys Met Ser Phe Ser Lys Gly Lys Ser Asp Thr Ser
130 135 140

Trp Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Met Ile Gly His Gln Phe Asp His Glu
145 150 155 160

Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Val Ser Val Arg Gly Lys Gly Glu Lys
165 170 175

Ile Ser Leu Trp Thr Lys Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala Gln Val Ser
180 185 190

Ile Gly Lys Gln Trp Lys Gln Phe Leu Asp Tyr Ser Asp Ser Val Gly
195 200 205

Phe Ile Phe His Asp Asp Ala Lys Arg Leu Asp Arg Asn Ala Lys Asn
210 215 220

Arg Tyr Thr Val
225

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce dégénérée

<400> 10

tctagataca ayaatatcca ycaccgaagc aa

32

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce dégénérée

<400> 11

tctagatggg rgcagacttt caytggtt

28

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Capsicum annuum

<400> 12

gtatgagaaa ctaaaacta

18

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Capsicum annuum

<400> 13

caacttttca gtacgaattg tggtt

25

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Capsicum annuum

<400> 14

tccgacattg catcaagaat tatak

25

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Lycopersicon esculentum

<400> 15

aatgagaaa ctaaaacta

18

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Lycopersicon esculentum

<400> 16

ctttccagta cgaattgtgt ttctt

25

<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> Lycopersicon esculentum

<400> 17
ctgcatcaag aactatacgg tgtaa 25

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Capsicum annuum

<400> 18
aaaagcacac agcaccaaca 20

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> Capsicum annuum

<400> 19
tattccgaca ttgcatcaag aa 22

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> Capsicum annuum

<400> 20
agactttcat tgtttcaagc ataa 24

<210> 21
<211> 25
<212> DNA
<213> Capsicum annuum

<400> 21
gattagaaag tgcaaacc aatac 25

<210> 22
<211> 228
<212> PRT
<213> Capsicum annuum

<220>
<221> VARIANT
<222> (67)..(67)
<223> Glu chez Yolo Y, Avelar, Vania, PM994, Florida, C69, CM334, PM1014
, et Per

<220>
<221> VARIANT
<222> (205)..(205)

<223> Gly chez PM1008, C69, CM334, PM1014, et Per

<220>

<221> VARIANT

<222> (109)..(109)

<223> Asn chez Florida

<220>

<221> VARIANT

<222> (79)..(79)

<223> Arg chez Yolo Y, Avelar, Vania, PM994

<220>

<221> VARIANT

<222> (68)..(68)

<223> Glu chez PM 1008

<220>

<221> VARIANT

<222> (73)..(73)

<223> Asp chez PM 1008

<220>

<221> VARIANT

<222> (74)..(74)

<223> Asp chez PM 1008

<400> 22

Met Ala Thr Ala Glu Met Glu Lys Thr Thr Thr Phe Asp Glu Ala Glu
1 5 10 15

Lys Val Lys Leu Asn Ala Asn Glu Ala Asp Asp Glu Val Glu Glu Gly
20 25 30

Glu Ile Val Glu Glu Thr Asp Asp Thr Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Glu
35 40 45

Ile Ala Thr Lys His Pro Leu Glu His Ser Trp Thr Phe Trp Phe Asp
50 55 60

Asn Pro Val Ala Lys Ser Lys Gln Ala Ala Trp Gly Ser Ser Leu Arg
65 70 75 80

Asn Val Tyr Thr Phe Ser Thr Val Glu Asp Phe Trp Gly Ala Tyr Asn
85 90 95

Asn Ile His His Pro Ser Lys Leu Val Val Gly Ala Asp Leu His Cys
100 105 110

Phe Lys His Lys Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Val Cys Ala Asn
115 120 125

Gly Gly Thr Trp Lys Met Ser Phe Ser Lys Gly Lys Ser Asp Thr Ser
130 135 140

Trp Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Met Ile Gly His Gln Phe Asp His Glu
145 150 155 160

Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Val Ser Val Arg Gly Lys Gly Glu Lys
165 170 175

15/16

Ile Ser Leu Trp Thr Lys Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala Gln Val Ser
180 185 190

Ile Gly Lys Gln Trp Lys Gln Phe Leu Asp Tyr Ser Asp Ser Val Gly
195 200 205

Phe Ile Phe His Asp Asp Ala Lys Arg Leu Asp Arg Asn Ala Lys Asn
210 215 220

Arg Tyr Thr Val
225

<210> 23

<211> 231

<212> PRT

<213> Lycopersicon hirsutum

<220>

<221> VARIANT

<222> (48)..(48)

<223> Phe chez PI247087

<220>

<221> VARIANT

<222> (68)..(68)

<223> Lys chez PI247087

<220>

<221> VARIANT

<222> (77)..(77)

<223> Asp chez PI247087

<220>

<221> VARIANT

<222> (109)..(109)

<223> Met chez PI247087

<400> 23

Met Ala Ala Ala Glu Met Glu Arg Thr Met Ser Phe Asp Ala Ala Glu
1 5 10 15

Lys Leu Lys Ala Ala Asp Gly Gly Gly Gly Glu Val Asp Asp Glu Leu
20 25 30

Glu Glu Gly Glu Ile Val Glu Glu Ser Asn Asp Thr Ala Ser Tyr Leu
35 40 45

Gly Lys Glu Ile Thr Val Lys His Pro Leu Glu His Ser Trp Thr Phe
50 55 60

Trp Phe Asp Asn Ser Thr Thr Lys Ser Arg Gln Thr Ala Trp Gly Ser
65 70 75 80

Ser Leu Arg Asn Leu Tyr Thr Phe Ser Thr Val Glu Asp Phe Trp Gly
85 90 95

Ala Tyr Asn Asn Ile His His Pro Ser Lys Leu Ile Met Gly Ala Asp
100 105 110

Phe His Cys Phe Lys His Lys Ile Glu Pro Gln Trp Glu Asp Pro Val

115	120	125
Cys Ala Asn Gly Gly Thr Trp Lys Met Ser Phe Ser Lys Gly Lys Ser		
130	135	140
Asp Thr Ser Trp Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Met Ile Gly His Gln Phe		
145	150	155
Asp His Gly Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Val Ser Val Arg Ala Lys		
165	170	175
Gly Glu Lys Ile Ala Leu Trp Thr Lys Asn Ala Ala Asn Glu Thr Ala		
180	185	190
Gln Val Ser Ile Gly Lys Gln Trp Lys Gln Phe Leu Asp Tyr Ser Asp		
195	200	205
Ser Val Gly Phe Ile Phe His Asp Asp Ala Lys Arg Leu Asp Arg Ser		
210	215	220
Ala Leu Asn Arg Tyr Thr Val		
225	230	